

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**MAÍRA TRANCOZO**

**CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE MUTAÇÕES DOS GENES *LEPRE1*,  
*CRTAP*, *PPIB*, *FKBP10*, *WNT1*, *SP7*, *SERPINF1* EM OSTEOGÊNESE  
IMPERFEITA**

VITÓRIA  
2016

**MAÍRA TRANCOZO**

**CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE MUTAÇÕES DOS GENES *LEPRE1*,  
*CRTAP*, *PPIB*, *FKBP10*, *WNT1*, *SP7*, *SERPINF1* EM OSTEOGÊNESE  
IMPERFEITA**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia do Centro de Ciências  
da Saúde da Universidade Federal do  
Espírito Santo, como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Flavia de Paula

VITÓRIA  
2016

**MAÍRA TRANCOZO**

**CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE MUTAÇÕES DOS GENES *LEPRE1*,  
*CRTAP*, *PPIB*, *FKBP10*, *WNT1*, *SP7*, *SERPINF1* EM OSTEOGÊNESE  
IMPERFEITA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 02 de março de 2016

**Profa. Dra. Flavia de Paula**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**(Orientadora)**

**Prof. Dr. Carlos Magno Da Costa**  
**Maranduba**  
**Universidade Federal de Juiz de Fora**

**Profa. Dra. Melissa de Freitas Cordeiro-Silva**  
**Faculdade Católica Salesiano do Espírito Santo**

**Profa. Dra. Flavia Imbroisi Valle Errera**  
**Escola Superior de Ciências da Santa Casa**  
**de Misericórdia de Vitória**

**Profa. Dra. Maria do Carmo Pimentel**  
**Batitucci**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**

VITÓRIA  
2016

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus em primeiro lugar por que sem ele eu não estaria aqui;

Aos meus pais por me apoiarem desde minha infância a estudar e alcançar meus objetivos de vida.

Agradeço a equipe do NGHM pelo apoio em especial a Clara Barbirato que me ajudou muito durante a graduação e o mestrado.

Agradeço à professora Flavia de Paula, por me deixar fazer parte de seu laboratório desde a graduação e pela disponibilidade, compreensão, competência e paciência para me orientar. E por ter acrescentado à minha formação acadêmica.

Agradeço às professoras Maria Rita Passos-Bueno e Mayana Zatz pela parceria na execução do projeto.

Agradeço à Ágatha pelo auxílio na análise dos dados de NGS.

Agradeço à UFES pelo espaço, à FACITEC, MCTI/CNPQ/MEC/CAPES e a CNPq/MS-Decit/SESA/FAPES pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A Osteogênese Imperfeita (OI) ou doença dos ossos frágeis é uma desordem hereditária dos tecidos conjuntivos que contém colágeno em sua formação. Mais de 15 genes relacionados com herança recessiva têm sido relatados dos últimos anos. A maioria destes genes codificam proteínas responsáveis por modificações pós traducionais do colágeno I. Com o objetivo de caracterizar o padrão de mutações em genes relacionados com a OI de padrão de herança autossômica recessiva no Espírito Santo foram estudados por meio das técnicas de *Next Generation Sequencing* (NGS) e Sequenciamento de Sanger os genes *LEPRE1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SP7*, *SERPINF1*, *FKBP10* e *WNT1* os quais apresentam maior frequência de mutações descritas atualmente de 22 pacientes não consanguíneos que apresentavam diagnóstico clínico compatível com a doença atendidos no Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória de Vitória/ES. Foram encontradas alterações potencialmente patogênicas nos genes *LEPRE1* e *FKBP10* em cinco pacientes. Dois pacientes são heterozigotos para mutações *missense* no gene *LEPRE1* (c.1087 A>G e c.2024 G>T). Os outros três pacientes são portadores de mutações no gene *FKBP10*, dois pacientes apresentam mutações *frameshift* em homozigose (c.825dupC e c.15dupC) e um paciente é portador de duas mutações em heterozigose composta (c.A179C e c.1063+2T>C). A gravidade da doença nestes pacientes varia de moderado a grave. Os resultados deste trabalho sugerem que a maioria das mutações que causam OI de herança recessiva em pacientes do ES estão localizadas nos genes *LEPRE1* e *FKBP10*. Além disto, de acordo com os resultados, mutações nos genes *CRTAP*, *PPIB*, *SP7*, *SERPINF1* e *WNT1* causando OI são raras na população estudada. A caracterização de mutações em genes relacionados com OI em diferentes populações ajuda a melhorar nosso conhecimento sobre o padrão de variações genéticas em OI e auxiliam no planejamento de estratégias mais eficientes que viabilizem o diagnóstico molecular da doença e o aconselhamento genético junto às famílias.

Palavras-chave: Osteogênese Imperfeita. Colágeno I. Herança autossômica recessiva. *Next Generation Sequencing*. *LEPRE1*. *FKBP10*.

## ABSTRACT

The Osteogenesis Imperfecta (OI) or brittle bone disease is a hereditary disorder of connective tissue that contains collagen in your training. More than 15 distinct genes causing recessive forms have been reported in recent. Mainly related to genes encoding proteins responsible for post-translational modification of collagen I. In order to characterize the pattern of mutations in genes related to recessive pattern of osteogenesis imperfecta we analyzed the genes *LEPRE1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SP7*, *SERPINF1*, *FKBP10* and *Wnt1* which exhibit higher mutation frequency of 22 patients presently described non-consanguineous through Next Generation Sequencing and Sequencing Sanger of patients with clinical diagnosis of osteogenesis imperfect from Espírito Santo assisted at Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória de Vitória/ES. Potentially pathogenic changes were found in *LEPRE1* e *FKBP10* genes in five patients. Two patients carries missense mutations in heterozygous states on *LEPRE1* gene (c.1087 A>G e c.2024 G>T changes). The other three patients carry mutations on *FKBP10* gene. Two of them have frameshift changes in homozygosity (c.825dupC e c.15dupC) and the last one carries two mutations in compound heterozygosity (c.A179C e c.1063+2T>C). The clinical aspects of the disease in these patients change the moderated to grave. The results suggest that the majority of mutations that causing OI with autosomal recessive inheritance in patients from ES are localized on *LEPRE1* e *FKBP10* genes. Moreover, according to the results, mutations on *CRTAP*, *PPIB*, *SP7*, *SERPINF1* and *WNT1* genes are rare on studied population. The characterization of mutation on genes that causing OI on different populations can help to improve our knowledge about the pattern of genetic changes in OI. Furthermore these kinds of studies can help in the design of strategies more efficient that be able the molecular diagnosis of the disease and genetic counseling with families.

Key words: Osteogenesis Imperfecta. Collagen I. Inheritance autosomal recessive. Next Generation Sequencing. *LEPRE1*. *FKBP10*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Figura representativa do exemplar dissecado por Willem Vrolik.....	
Figura 2: Radiografia do exemplar encontrado pelo professor John Garstang.....	
Figure 3: Esquema da síntese no colágeno tipo I.....	
Figure 4: Esquema da produção do colágeno.....	
Figure 5: Heredograma de casos familiares.....	
Figura 6: Sequenciamento das alterações encontradas nos pacientes P.5 e P.15.....	
Figure 7: Sequenciamento das alterações encontradas nos pacientes P.7, P.10 e P.13.....	

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Primers utilizados para a amplificação das partes codificantes do gene LEPRE1.....	
Quadro 2: Padronização referente às etapas de amplificação do DNA.....	
Quadro 3: Reagentes presentes na reação de amplificação do DNA.....	
Quadro 4: Primers utilizados para a amplificação das sequencias codificantes do gene WNT1.....	
Quadro 5: Padronização referente às etapas de amplificação do DNA.....	



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela 1: Classificação de Sillence e colaboradores (1979).....	
Tabela 2: Classificação dos tipos de Osteogênese Imperfeita de acordo com o gene mutado.....	
Tabela 3: Genes relacionados com a forma recessiva de osteogênese imperfeita e o número de mutações.....	
Tabela 4: Informações referentes aos pacientes.....	
Tabela 5: Informações referentes às alterações encontradas.....	

## LISTA DE SIGLAS

*ALPL* – gene que codifica a proteína *ALPL Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme*

APS – persulfato de amônio

*BMP1* – gene da *BMP1 Bone Morphogenetic Protein 1*

BWA – Burrows-Wheeler Aligner

CNV – Copy Number Variant ou Variação no número de cópias

COL1A1 – gene do colágeno tipo I, alfa I

COL1A2 – gene do colágeno tipo I, alfa II

*CREB3L1* – gene da *OASIS old astrocyte specifically induced substance*

*CRTAP* – gene da *Cartilage-Associated Protein*

CsA – ciclosporina A

CYP – ciclofilinas

Cys – cisteína

*CyPB* – Ciclofilina B

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – desoxirribonucleotídeo trifosfato

*FKBP10* – gene da *FK506-Binding Protein 10*

FZD – *frizzled*

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

ES – Espírito Santo

GATK – *The Genome Analysis Toolkit*

Gli – Glicina

HINSG – Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória

*Hsp47* – *Heat-Shock Protein 47*

*IFITM5* – gene da *BRIL Bone-restricted ifitm-like protein*

kDa – Kilodalton

LEPRE1- gene da prolil-3 hidroxilase

LH2 – lisil -hidroxilase 2

Lis – lisina

Min – minutos

mL – mililitros

mM – milimolar

NCBI – National Center for Biotechnology Information ou Centro Nacional de Informação Biotecnológica

ng/uL – nanograma por microlitro

ng – nanogramas

NGS – *Next Generation Sequencing*

OI - Osteogênese Imperfeita

*P3H1* – prolil-3 hidroxilase

*P4HB* – prolil 4-hidroxilase, beta polipeptideo

Pb – pares de base

PCR – polymerase chain reaction ou reação em Cadeia da Polimerase

PDI – proteína dissulfeto isomerase

*PEDF* – *Pigment Epithelium-Derived Factor*

*PLS3* – gene da *Actin-binding protein plastin 3*

PPIase – peptidil-prolil isomerases cis–trans

*PPIB* – gene da ciclofilina B

*PLOD2* – *Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2*

Q-PCR – *quantitative PCR* ou PCR quantitativo

RE – retículo endoplasmático

rpm – rotações por minuto

*Sec24D* – gene da Sec24D

SDS – dodecil sulfato de sódio

Seg – segundos

*SERPINH1* – gene da *serpin peptidase inhibitor*

*SERPINF1* – gene da *Pigment epithelium derived factor*

SNP – *Single-nucleotide polymorphism* ou Polimorfismo de nucleotídeo único

*SP7/Osterix* – *Transcription Factor Sp7*

SPARC – gene da SPARC

SSCP – single-strand conformation polymorphism ou polimorfismo de conformação de fita simples

TBE – tampão tris/borato/EDTA

*TMEM38B* – *Transmembrane Protein 38B*

*TRIC-B* – *Trimeric Intracellular Cation Channel Type B*

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

UTR – untranslated region ou regiões não codificantes

*WNT1* – *wingless-type MMTV integration site family, member 1*

µL – microlitro

°C – graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1- INTRODUÇÃO.....</b>	
<b>2 REVISAO BIBLIOGRAFICA.....</b>	
2.1-HISTÓRICO DA DOENÇA.....	
2.2 – COLÁGENO.....	
2.2.1 - SÍNTESE DAS CADEIAS DE COLÁGENO TIPO 1.....	
2.3 - TIPOS DE OI.....	
2.3.1 - CLASSIFICAÇÃO.....	
2.4 - GENES COM PADRÃO DE HERANÇA RECESSIVO.....	
2.4.1 - COMPLEXO 3-HIDROXILAÇÃO.....	
2.4.2 - CHAPERONAS MOLECULARES.....	
2.4.3 - FATOR DE TRASCRIÇÃO.....	
2.4.3 - FATOR ANTI-ANGIOGÊNICO.....	
2.4.4 - PROTEÍNA TRASMENBRANA.....	
2.4.5 - C-PEPTIDASE COLÁGENO TIPO I.....	
2.4.6 - TELOPEPTÍDEO LISIL HIDROXILASE.....	
2.4.7 - PROTEÍNA SINALIZADORA.....	
2.4.8 - PROTEÍNA TRASDUTORA.....	
2.4.9 – PROTEÍNA MODELADORA.....	
2.4.10 – PROTEÍNA EXPORTADORA.....	
2.4.11 – PROTEÍNA MODULADORA.....	
2.4.12 – PROTEÍNA DE MONTAGEM.....	
<b>3 – OBJETIVOS.....</b>	
3.1 - Objetivo Geral:.....	
3.2 - Objetivos específicos:.....	
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	
4.1 PACIENTES.....	
4.2 MÉTODOS.....	
4.2.1 Extração de DNA.....	
4.2.2 Amplificação do DNA.....	
4.2.3 ELETROFORESE PARA VERIFICAR A AMPLIFICAÇÃO DO DNA.....	
4.2.4 SEQUENCIAMENTO.....	

4.2.4 NEXT GENERATION SEQUENCING.....	
<b>5. RESULTADOS.....</b>	
5.1 SEQUENCIAMENTO DIRETO DO GENE <i>LEPRE1</i> .....	
5.2 NEXT GENERATION SEQUENCING.....	
5.2.1 – NGS DO GENE <i>LEPRE1</i> .....	
5.2.2 – NGS DOS GENES <i>CRTAP</i> , <i>PPIB</i> , <i>SERPINH1</i> e <i>SP7</i> .....	
5.2.3 - NGS DO GENE <i>FKBP10</i> .....	
5.3 SEQUENCIAMENTO DIRETO DO GENE <i>WNT1</i> .....	
<b>6 – DISCUSSÃO.....</b>	
<b>8 – REFERÊNCIAS:.....</b>	

## 1- INTRODUÇÃO

A Osteogênese Imperfeita (OI) ou doença dos ossos frágeis é uma desordem hereditária dos tecidos conjuntivos que contém colágeno em sua formação. As principais características observadas nesta doença são: fraturas, fragilidade, deformidade e baixa densidade óssea, ampla heterogeneidade clínica e genética. Os pacientes com OI também podem apresentar baixa estatura, esclera azulada, deficiência auditiva, dentinogênese Imperfeita, problemas respiratórios e cerebrais devidas à mal formação dos ossos presentes na região dos pulmões e crânio. A incidência pode variar entre os autores de 5 a 6/100.000 habitantes (MARINI, 2010; SILLANCE et, 1979; VAN DIJK et al., 2010).

Originalmente a Osteogênese Imperfeita foi classificada como tipos de I a IV, através de dados clínicos e radiológicos por Sillence et al (1979). Essa classificação é utilizada até hoje, porém há uma tentativa de reclassificação utilizando-se critérios histológicos e genéticos para enquadrar os pacientes em novos tipos de OI (VAN DIJK et al., 2010).

O diagnóstico pode ser feito ainda na gravidez, dependendo do tipo de OI, por meio de exames de ultrassonografia trans-abdominal ou trans-vaginal, testes laboratoriais e pelo histórico familiar. Quando crianças os indivíduos afetados podem ser identificados por avaliação clínica, exames de raios-X e genéticos (BYERS et al., 2006).

O tratamento para a Osteogênese Imperfeita consiste na administração de bisfosfonatos intravenosos, normalmente é administrada uma infusão intravenosa a cada três meses, 4 horas por dia, durante três dias consecutivos, sendo muito invasivo. Os bisfosfonatos inativam os osteoclastos inibindo a reabsorção óssea. Assim, com este tratamento há aumento na densidade óssea, redução no número de fraturas e de deformidades. Existe ainda o tratamento via oral, sendo um tratamento menos invasivo e inconveniente para os pacientes (BASEL et al., 2009).

A forma clássica de OI é causada por mutações autossômicas dominantes nos genes *COL1A1* ou *COL1A2*, que codificam as cadeias alfa-1 e alfa-2 do colágeno

tipo 1 (STEPHEN et al., 2014; MAASALU et al., 2015). Além desses dois, mutação no gene *IFITM5* também está associada ao padrão de herança autossômico dominante. Este gene codifica uma proteína transmembrana altamente enriquecida em osteoblastos durante a mineralização óssea. A mutação mais frequente nesse gene está localizada na região 5' UTR que gera um códon alternativo de início fazendo com que a proteína produzida apresente cinco adicionais aminoácidos na porção N terminal da proteína (FARBER et al., 2014; GUILLE'N-NAVARRO et al., 2014; HOYER-KUHN et al., 2014; SEMLER et al., 2012; ).

Formas recessivas têm sido relatadas nos últimos anos e estão relacionadas, principalmente, a genes que codificam proteínas responsáveis por participarem de processos como a transcrição, transporte e modificações pós-traducionais do colágeno tipo I tais como os genes *LEPRE1*, *CRTAP*, *PPIB*, *FKBP10*, *SERPINF1*, *SP7*, *WNT1* dentre outros (FORLINO et al., 2011). Atualmente foram relacionados com a Osteogênese Imperfeita mais três genes relacionados com padrão de herança recessivo que também participam das modificações pós-traducionais do colágeno (*P4HB*, *SEC24D*, *SPARC*) (GARBES, 2015; MENDOZA-LONDONO, 2015; RAUCH, 2015).

Devido à heterogeneidade clínica entre os pacientes, é difícil estabelecer um padrão de características relacionadas às mutações em cada um dos genes. Isso nos mostra a importância de novas pesquisas com genes já relacionados à doença para tentarmos estabelecer uma caracterização mais eficaz e um diagnóstico molecular focado em genes que causem características fenotípicas típicas.

O Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória (HINSG) DE Vitória-ES é um dos centros de referência do Espírito Santo no tratamento de Osteogênese Imperfeita. Este atendimento cria uma demanda de pacientes com sintomas sugestivos de Osteogênese Imperfeita que carecem de diagnóstico molecular. O presente trabalho teve como enfoque a caracterização de mutações em genes relacionados a Osteogênese Imperfeita de pacientes com padrão de herança autossômico recessivo no Espírito Santo.

Estas informações poderão auxiliar no desenvolvimento de estratégias de diagnóstico molecular da doença. Esta pesquisa é de extrema importância, pois



contribui com estudos de prognóstico da doença envolvendo aspectos genéticos, auxiliando na escolha do melhor tratamento para cada paciente. Além disto, o desenvolvimento de estratégias moleculares para o diagnóstico da Osteogênese Imperfeita contribuirá para fornecer um aconselhamento genético mais eficaz, uma vez que esta doença apresenta heterogeneidade genética e dependendo do gene mutado e do padrão de herança, o risco de recorrência da doença pode ser alterado.

## 2 REVISAO BIBLIOGRAFICA

### 2.1-HISTÓRICO DA DOENÇA

O professor de Anatomia, Fisiologia, História Natural e Cirurgia Teórica da *Athenaeum Illustre of Amsterdam Willem Vrolik* foi um dos primeiros de sua época, em 1849, a perceber que a maioria das displasias ósseas não era adquirida após o nascimento, mas poderia ser uma insuficiência na “energia generativa” durante gravidez. Tal afirmativa foi corroborada quando estudando peças anatômicas encontrou comprometimento na ossificação primária e não uma degeneração secundária. Ele descreveu em seu livro, *Patologias Anatômicas*, um recém-nascido que morreu três dias após o nascimento com inúmeras fraturas (Figura 1), através da análise de um exemplar doado a coleção de seu pai, o também anatomista Gerard Vrolik (BALJET et al., 2002).

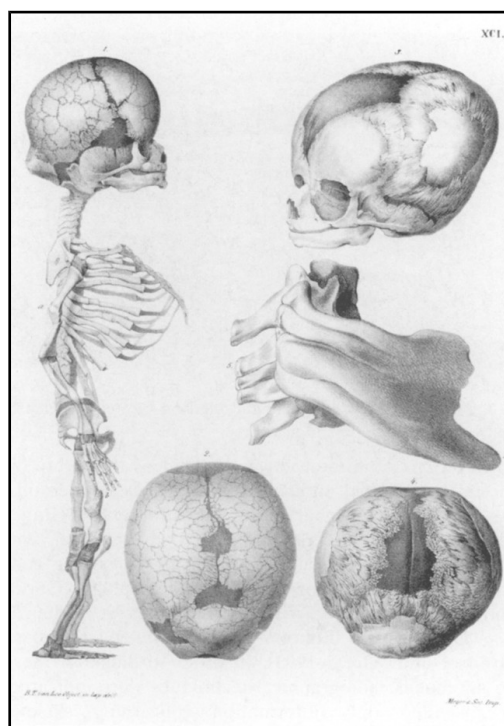


Figura 1: Figura representativa do exemplar dissecado por Willem Vrolik (BALJET et al., 2002)

Através da dissecação do exemplar o professor descobriu que o recém-nascido apresentava desenvolvimento esquelético deficiente, os ossos do crânio apresentavam fraturas, irregularidades e unidos por aros arredondados, o rosto era curto e estreito, os demais ossos apresentavam múltiplas fraturas, em algumas delas foram observadas formações de calos provenientes de uma prévia regeneração intrauterina. Em um de seus desenhos da descrição deste exemplar foi utilizado o título em latim *Osteogenesis Imperfecta*, sendo o primeiro a introduzir o termo na literatura (BALJET et al, 1984 e 2002).

Um ano após o nascimento da criança anterior, a mesma família teve outra criança a qual também apresentava características típicas da doença, Willem Vrolik a descreveu e posteriormente em 1998 foi classificada como OI tipo II por (OOSTRA et al., 1998 b).

Em 1969 Gray, descreveu o que seria o primeiro caso de Osteogênese Imperfeita a partir de uma múmia egípcia datada da 21ª dinastia a cerca de 1.000 anos antes de Cristo encontrada pelo professor John Garstang (GARSTANG et al., 1907) a margem do rio Nilo. Através da observação do professor e de exames radiológicos notou-se que o exemplar apresentava dentinogênese imperfeita, ossos longos deformados, os ossos dos membros inferiores eram arqueados (Figura 2) e o córtex era composto de linhas onduladas e esponjosas, típicas características da doença (GRAY et al., 1969; LOWENSTEIN et al., 2009).



Figura 2: Radiografia do exemplar encontrado pelo professor John Garstang (GRAY, 1969)

Esse achado nos mostra que a doença não é uma condição recente e que acometia povos da antiguidade nos fornecendo assim um pouco da história e evolução da doença (Lowenstein et al., 2009).

## **2.2 – COLÁGENO**

A maior porção proteica do organismo de mamíferos é formada de colágeno, sendo assim um quarto do peso de proteína total. Ele é agrupado em famílias de acordo com características funcionais e estruturais. O colágeno tipo I é a proteína mais importante dos ossos, pele, tendões, ligamentos, córnea e esclera, tecidos, vasos sanguíneos e órgãos ocos (MAASALU et al., 2015).

As principais causas da Osteogênese Imperfeita são defeitos quantitativos ou qualitativos do colágeno tipo I. Esta molécula é constituída de três cadeias polipeptídicas, pro- $\alpha$ 1 e pro- $\alpha$ 2 na proporção 2:1, formando uma tripla hélice apresentando a cada três resíduos uma glicina (Gli- X – Y). O padrão mais frequente de aminoácidos do colágeno tipo I é formado pela unidade tri peptídica Glicina-Prolina-Hidroxiprolina. Essa sequência contribui para a estabilidade da estrutura helicoidal da molécula e apresenta-se em 10% de toda a cadeia de colágeno (STEPHEN et al., 2014).

### **2.2.1 - SÍNTESE DAS CADEIAS DE COLÁGENO TIPO 1**

O colágeno tipo 1 é a proteína mais abundante da matriz extracelular, encontrada principalmente nos ossos e pele, sendo extremamente importante para a formação dos mesmos (CHOI et al., 2009). As cadeias de pró-colágeno são sintetizadas com extensões que vão das extremidades amino ao carboxi-terminal e passam por diversos tipos de processamento até chegarem ao seu destino final (Figura 3).

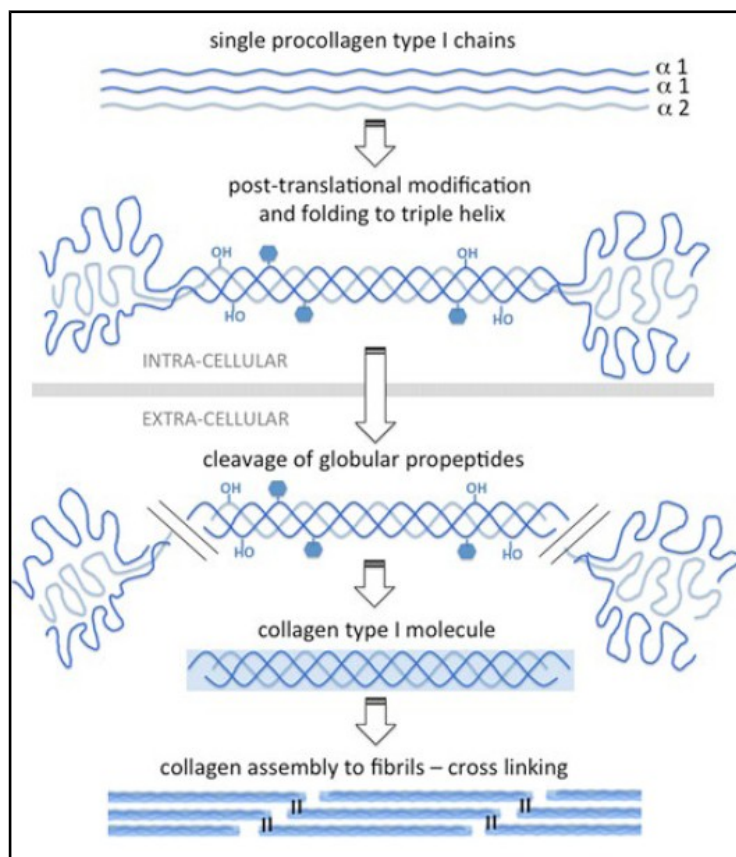


Figura 3: Esquema da síntese no colágeno tipo I (FRATZL-ZELMAN et al., 2015)

## 2.3 - TIPOS DE OI

### 2.3.1 - CLASSIFICAÇÃO

Em 1979 Sillence e colaboradores observaram uma grande variabilidade clínica entre seus pacientes e com isso propuseram em suas pesquisas uma classificação para a Osteogênese Imperfeita.

Esta classificação foi feita por meio de dados clínicos e radiológicos que permitiram categorizar a doença em quatro tipos que compreendem do mais leve até o inviável a vida. (TABELA 1)

Tabela 1: Classificação de Sillence e colaboradores (1979).

Classificação	Níveis de gravidade das características clínicas
Tipo I	Leve
Tipo II	Letal pré e pós nascimento
Tipo III	Grave
Tipo IV	Moderada

Atualmente, com os achados de novos genes de herança recessiva, foram feitas reclassificações que se baseiam nos dados histológicos e genéticos. A classificação mais recente feita por FRATZL-ZELMAN et al. (2015) atribui à OI os tipos até o XI, sendo que alguns casos ainda continuam sem classificação (Tabela 2).

Tabela 1: Classificação dos tipos de Osteogênese Imperfeita de acordo com o gene mutado.

Tipo de OI	Gene	Tipo de	Proteína	Efeitos sobre a
Formas Clássicas de OI				
Tipos I, II, III e IV	COL1A1 e COL1A2	Autossômico dominante	Pró-colagênio alfa1 e alfa2	Anormalidades na estrutura primária ou diminuição da quantidade de cadeias de colágeno tipo I.
Novas formas de OI (classificados e não classificados)				
Tipo V	IFITM5	Autossômico dominante	Bone-restricted ifitm-like protein (BRIL)	BRIL é uma pequena proteína transmembrana dos osteoblastos que pode regular os primeiros passos de mineralização.
VI	SERPINF1	Autossômico recessivo	Pigment epithelium derived factor (PEDF)	PEDF é produzida e secretada por osteoblastos, é um fator anti-angiogênico potente.
VII	CRTAP	Autossômico recessivo	Cartilage-associated protein (CRTAP)	Processamento da tripla hélice do colágeno tipo I intracelular: defeito na 3-hidroxilação.

VIII	<i>LEPRE1</i>	Autossômico recessivo	<i>Prolyl 3-hydroxylase</i> (P3H1)	
IX	<i>PPIB</i>	Autossômico recessivo	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B</i> (PPIB)	
X	<i>SERPINH1</i>	Autossômico recessivo	<i>Heat-shock protein 47</i> (HSP47)	Atividade de chaperona: Juntamente com PPIB liga-se e estabiliza a molécula de pró-colágeno dobrada no retículo endoplasmático.
XI	<i>FKBP10</i>	Autossômico recessivo	FKBP65	Hidroxilação telopeptídica insuficiente em atividade de chaperona; retardo e diminuição da síntese do colágeno; ligações cruzadas defeituosas do colágeno alterado.
	<i>PLOD2</i>	Autossômico recessivo	<i>Lysyl hydroxylase 2</i> (LH2)	Hidroxilação telopeptídica alterada do aminoácido lisina do colágeno. Crítico para <i>cross linking</i> de colágeno na matriz.
Não Classificados	<i>BMP1</i>	Autossômico recessivo	<i>Bone morphogenic Protein 1</i> (BMP1)	Processamento de colágeno extracelular: clivagem do C-pró-peptídeo de colágeno tipo I.
	<i>C-propeptide cleavage site</i>	Autossômico recessivo	<i>C-propeptide cleavage site</i>	Processamento de colágeno extracelular: defeitos no sítio de clivagem do C-propeptídeo.
	<i>SP7/OSX</i>	Autossômico recessivo	<i>SP7/Osterix</i>	Defeitos na maturação de osteoblastos.

<i>WNT1</i>	Autossômico recessivo	<i>WNT1</i>	WNT interage com LRP5 na superfície das células. Diferentes formas de fragilidade óssea.
<i>TMEM38B</i>	Autossômico recessivo	TRIC-B (envolvido na liberação de Ca <sup>2+</sup> intracelular)	Defeito no processamento colágeno: afeta regulação de cálcio específica de colágeno, chaperonas e modificando enzimas no retículo endoplasmático.
<i>CREBL1</i>	Autossômico recessivo	OASIS	Diminui a transcrição de <i>COL1A1</i> .
<i>PLS3</i>	Autossômico recessivo	<i>Actin-binding protein plastin 3</i>	Não está claro.

Fonte: Modificado de FRATZL-ZELMAN, 2015.

Diante desses dados percebe-se uma grande dificuldade de classificação dos pacientes diagnosticados. Nos casos em que o diagnóstico genético não é realizado adota-se a classificação de Sillence e col. (1979). Ao serem realizadas as análises moleculares os pacientes passam a ser categorizados de acordo com o gene no qual apresenta alteração (FRATZL-ZELMAN, 2015).

## 2.4 - GENES COM PADRÃO DE HERANÇA RECESSIVO

Os primeiros genes recessivos identificados relacionados com osteogênese imperfeita estão envolvidos com modificações pós-traducionais da molécula de colágeno (figura 4). Atualmente existem genes descritos relacionados com Osteogênese Imperfeita associados a herança autossômica recessiva nas seguintes vias do metabolismo ósseo:



- o complexo 3-hidroxilação (*CRTAP*, *LEPRE1* e *PPIB*);
- as chaperonas moleculares (*SERPINH1* e *FKBP10*);
- o fator de transcrição específico de osteoblasto (*SP7*);
- o fator anti-angiogênico de matriz extracelular (*SERPINF1*);
- proteína transmembrana (*TMEM38B*);
- o C-peptidase colágeno tipo I (*BMP1*);
- telopeptídeo lisil hidroxilase (*PLOD2*);
- proteína sinalizadora (*WNT1*) e
- transdutor do retículo endoplasmático (*CREB3L1*) (CAPARRO'S-MARTIN et al., 2013; MARTINEZ-GLEZ et al., 2012; SYMOENS et al., 2013).

Ao todo esses genes somam 513 mutações já descritas no banco de dados de osteogênese imperfeita (TABELA 3).

Tabela 2: Genes relacionados com a forma recessiva de osteogênese imperfeita e o número de mutações

Genes associados ao padrão de herança recessivo	Número de mutações já descritas
<i>BMP1</i>	23
<i>CREB3L1</i>	2
<i>CRTAP</i>	53
<i>FKBP10</i>	103
<i>LEPRE1</i>	160
<i>P4HB</i>	2
<i>PLOD2</i>	22
<i>PLS3</i>	7
<i>PPIB</i>	24
<i>SERPINF1</i>	52
<i>SERPINH1</i>	10
<i>SEC24D</i>	4
<i>SP7</i>	2
<i>SPARC</i>	4
<i>TMEM38B</i>	14
<i>WNT1</i>	31

Fonte: Banco de dados de mutações de Osteogênese Imperfeita (<http://www.le.ac.uk/ge/collagen/>). Acessado em Dezembro de 2015.

### 2.4.1 - COMPLEXO 3-HIDROXILAÇÃO

O Complexo proli 3-hidroxilase (Figura 4) é composto pelas proteínas *CRTAP*, *CyPB* e *P3H1* codificadas respectivamente pelos genes ***CRTAP***, ***PPIB*** e ***LEPRE1*** na

proporção de 1:1:1. Ele é formado no retículo endoplasmático e hidroxila um resíduo de prolina na posição 986 (Pro986) das cadeias alfa-1 de pró-colágeno dos colágenos tipos I e II (MARINI et al., 2007; MARINI et al., 2010; WILLAERT et al., 2009).

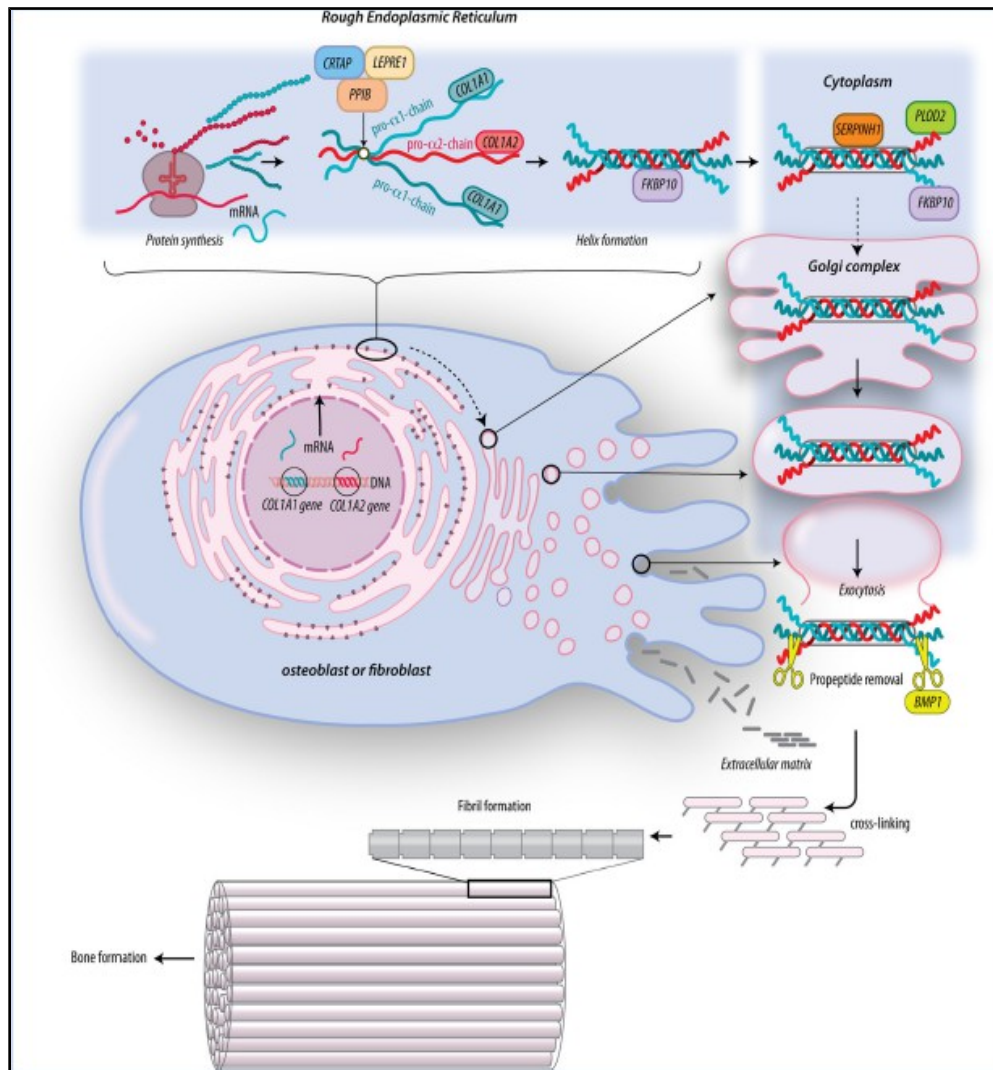


Figura 4: Esquema da produção do colágeno com os genes envolvidos nos processos de síntese das cadeias e genes que sintetizam proteínas que auxiliam nas modificações pós-traducionais (VAN DIJK et al., 2014)

O gene **LEPRE1** (Leucine-and Proline-Enriched Proteoglycan 1) localizado em 11p34.1 é composto por 15 exons e codifica a proteína prolil 3-hidroxiase 1 (P3H1).

No complexo a *P3H1* tem atividade prolil 3-hidroxiase, ficando a cargo dela a função de hidroxilar os resíduos de prolina nos filamentos de pró-colágeno alfa-1 do heterotrímero. As mutações no gene *LEPRE1* acarretam diminuição na transcrição

da proteína ou mesmo sua ausência, afetando sua função dentro do complexo *P3H1* (CABRAL et al., 2007; WILLAET et al., 2009; CAPARRO' S-MARTIN et al., 2013).

O gene ***CRTAP*** (*Cartilage-Associated Protein*) codifica a proteína *CRTAP*. Este gene é constituído de sete exons e está localizado no cromossomo 3p22.3.

A *CRTAP* não tem atividade enzimática, mas parece estabilizar a *P3H1*, responsável pela hidroxilação da prolina. Mesmo com os níveis normais de transcrição do *LEPRE1*, *P3H1* está ausente ou reduzida em fibroblastos de pacientes com mutações em *CRTAP*. *CRTAP* e *P3H1* são mutuamente protegidas no complexo, quando ocorre uma mutação nula em um dos genes causando a supressão da proteína, a outra está ausente ou diminuída, desestabilizando assim o complexo protéico (BEN AMOR et al., 2011; CHANG et al., 2009).

Pacientes que apresentam mutações em *CRTAP* demonstram ter pequenas quantidades de colágeno depositadas na matriz extracelular e desorganização da rede fibrilar, indicando assim que alterações no gene afetam a conformação do colágeno e a matriz extracelular. A ausência de *CRTAP* resulta também na perda da função do complexo e modificações excessivas na tripla hélice de colágeno devido a não hidroxilação dos resíduos de lisina (FRATZL-ZELMAN et al., 2010; VALLI et al., 2012).

A Ciclofilina B (*CyPB*) é codificada pelo gene Peptidil-prolil cis -trans isomerase PPIase B (***PPIB***) localizado no cromossomo 15q22.31 e constituído por cinco exons (BARNES et al., 2012).

A proteína pertence à família das ciclofilinas, um subconjunto de imunofilinas que pode ser inibida por ciclosporina A (CsA). Ela faz parte do complexo 3-hidroxilação sendo que há evidências que o complexo tenha atividade de chaperona e de PPIase, sendo essa última a cargo da *CYPB* (BARNES et al., 2010; BARNES et al., 2012).

A proteína intracelular Ciclofilina B de 21 kDa, pertence a família das ciclofilinas (CYP). CYPs é uma família de peptidil-prolil isomerases cis-trans (PPIases) que catalisam a isomerização cis-trans de ligações peptídicas. A fibra de pro-colágeno I possui cerca de 20% de resíduos de prolina na sua constituição, assim, a isomerização cis-trans feita pela *CYPB* é um fator importante na velocidade e na

dobragem da hélice de colágeno. (BARNES et al., 2012). (BARNES et al., 2010; PYOTT et al., 2011; VAN DIJK et al., 2009).

Mutações no gene podem acarretar em diminuição de função da proteína, resultando em diminuição das isomerizações cis-trans e aumento de modificações pós-traducionais do colágeno I. Como a Ciclofilina B também tem função na secreção intracelular do colágeno, alterações no gene também podem afetar a via (BARNES et al., 2010; VAN DIJK et al., 2009).

## 2.4.2 - CHAPERONAS MOLECULARES

O gene **SERPINH1** (*serpin peptidase inhibitor clade H member 1*) está localizado no cromossomo 11q13.5 sendo constituído por cinco exons, codifica *Hsp47* (*Heat-Shock Protein 47*), uma proteína da superfamília de serpina inibidora de proteinases. Tal proteína se encontra no retículo plasmático atuando como uma chaperona molecular na biossíntese do colágeno (CHRISTIANSEN et al., 2010).

Alterações no gene em questão resulta na desestabilização e perda de localização da Hsp47. Há evidências de que a Hsp47 juntamente com a FKBP65, codificada pelo gene **FKBP10** (*FK506-Binding Protein 10*) hajam em cooperação durante a maturação pós-traducional do pró-colágeno tipo I e por isso quando há uma alteração no SERPINH1 as proteínas não interajam corretamente demonstrando que as duas chaperonas fazem parte de uma mesma via celular relacionada com a doença (DURAN et al., 2015).

O gene **FKBP10** (*FK506-Binding Protein 10*) de 65 KDa é constituído de dez exons e está localizado no cromossomo 17q21.2. O gene codifica a proteína de ligação FKBP65 (CAPARRO' S-MARTIN et al., 2013; SHAHEEN et al., 2010).

A FKBP65 é uma proteína residente do retículo endoplasmático rugoso que faz parte da subfamília das imunofilinas que se ligam a FK506. A função da proteína FKBP65 de maior relevância para o metabolismo adequado do colágeno devido ao seu dobramento correto é o de chaperona (figura 4), mas esta proteína também possui função *peptidyl-prolyl cis-trans* isomerase (PPIase) (ALANAY et al., 2010; BARNES et al., 2012; KELLEY et al., 2011; SCHWARZE et al., 2013; SHAHEEN et al., 2011; VENTURI et al., 2012; ZHOU et al., 2014).

Alterações no gene podem causar ausência da atividade da chaperona *FKBP65* nas células produzindo agregados de pró-colágeno tipo I no RE e diminuição da *telopeptide lysine* hidroxilação do colágeno diminuindo a deposição do trimero na matriz extracelular (BARNES et al., 2012; BARNES et al., 2013; CAPARRO' S-MARTIN et al., 2013; SETIJOWATI et al., 2012; SHAHEEN et al., 2011).

### 2.4.3 - FATOR DE TRASCRIÇÃO

No cromossomo 12q13.13 está localizado o gene **SP7/Osterix** (*Transcription Factor Sp7*) com três exons, que codifica um fator de transcrição específico de osteoblastos que contém três domínios de ligação de DNA na extremidade C terminal essencial para a formação óssea (LAPUNZINA et al., 2010).

A proteína OXS é formada por 431 aminoácidos e pertence a um subgrupo da família *Krüppel-like*, caracterizada por conter três domínios invariáveis de ligação ao DNA, *Zinc Finger Cys2-His2*, em sua extremidade carboxi-terminal, com os três sítios de zinco que contribui para a especificidade da interação DNA-proteína. Cada *zinc-finger* reconhece uma sequência de trinucleotídeos consecutivos sendo o terceiro domínio o de maior atividade, no que diz respeito à afinidade ao DNA. Em modelos feitos com ratos foi observada sua atuação na regulação da diferenciação de pré-osteoblastos a osteoblastos, sendo esse um processo essencial para a formação óssea (LAPUNZINA et al., 2010).

### 2.4.3 - FATOR ANTI-ANGIOGÊNICO

O gene **SERPINF1** (*serpin peptidase inhibitor, clade F, member 1*) está localizado no cromossomo 17p13.3, é constituído de oito exons e codifica o *Pigment Epithelium-Derived Factor* (*PEDF*), uma glicoproteína segregada da superfamília das serpinas, que é conhecido por inibir a angiogênese expressa em vários tecidos, incluindo osteoblastos.

O *PEDF* é uma proteína multifuncional e um dos mais fortes inibidores da angiogênese conhecidos atualmente em humanos. Ela é uma glicoproteína de 50

kDa com 418 resíduos de aminoácidos que, entre outras propriedades, apresenta uma elevada afinidade pela matriz extracelular do colágeno. Indivíduos que apresentam mutação *SERPINF1* apresentam síntese, modificações pós-traducionais e secreção normais do colágeno tipo I. Acredita-se que o *PEDF* desempenha um papel na homeostase óssea ao inibir a reabsorção óssea, uma vez que regula positivamente a osteoprotegerina, um componente que inibe a maturação de osteoclastos (AL-JALLAD H et al., 2014; BECKER et al., 2011; CAPARRO´ S-MARTIN et al., 2013; CHO SY et al., 2013; GLORIEUX et al., 2002; HOMAN et al., 2011; RAUCH et al., 2012; VENTURI et al., 2012).

#### 2.4.4 - PROTEÍNA TRASMENBRANA

O gene ***TMEM38B*** (*Transmembrane Protein 38B*) codifica a *TRIC-B* (*Trimeric Intracellular Cation Channel Type B*), um canal monovalente envolvido no fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de armazenamentos intracelulares e na diferenciação celular. O *TMEM38B* possui seis exons e está localizado no cromossomo 9q31.1-31.3 (RUBINATO E et al., 2014; SHAHEEN et al., 2012).

Alterações no gene podem acarretar em um códon de parada prematuro formando uma proteína truncada com perda de cerca de um terço dos domínios funcionais dos canais de TRIC. Estas mudanças resultaram em alterações nos canais TRIC-B, causando mal funcionamento no mesmo, comprometendo os nível intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  e as vias de sinalização em células ósseas. Por fatores históricos, há uma ligação entre a população da Arábia Saudita e Península Arábica sugerindo um efeito fundador em mutações associadas ao *TMEM38B* (SHAHEEN et al., 2012; VOLODARSKY et al., 2013).

#### 2.4.5 - C-PEPTIDASE COLÁGENO TIPO I

A Proteína morfogenética óssea 1 (***BMP1***) pertence à família das metaloproteases que possuem domínios *astacin-like* protease e tem papel fundamental na rede de transporte tras-Golgi para a matriz extracelular. Esta proteína atua particularmente

na remoção proteolítica de pró-peptídeos C dos precursores de pró-colágeno das fibrilas de colágeno I, sendo de extrema importância para a montagem dos monômero de colágeno “maduros” em fibras (ASHARANI et al., 2012).

O processamento de pro-colágeno I pro-peptídeo C-terminal (PICP) é realizado pela família de proteína morfogenética óssea 1/ Tolloid-like de mamíferos, (*BMP1/TLD-like*), que é composta de quatro subunidades proteicas codificadas por três diferentes loci. *Bmp1* é sua maior isoforma, está localizado em 8p21.3 e apresenta 20 exons.

*BMP1/TLD-like* é composto por um sinal peptídico, seguido por um inibidor da protease do pro-domínio amino-terminal. Esta porção é removida por atividade proteolítica através da pró-proteína subtilisina, gerando fibras “maduras” de colágeno (MARTINEZ-GLEZ et al., 2012).

Em pacientes com a alteração em *BMP1*, as fibras maduras de colágenos não são geradas, demonstrando a importância do gene para o processo de formação óssea (ASHARANI et al., 2012).

#### 2.4.6 - TELOPEPTÍDEO LISIL HIDROXILASE

O gene ***PLOD2*** (*Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2*) é composto por 20 exons, está localizado no locus 3q24 e codifica a lisil -hidroxilase 2 (LH2), enzima responsável pela hidroxilação dos resíduos de lisina do telopeptídeo C terminal do colágeno tipo I. Estudos de expressão celular sugerem que a proteína codificada por este gene participa da atividade osteoblástica (VAN DER SLOT et al., 2003).

*PLOD2* passa pelo processo de *splicing* alternativo resultando em duas isoformas LH2a (curto) e LH2b (longo) tendo como diferença a inclusão de 63 pb no exon 13 no LH2b, gerando um exon extra. O gene *PLOD2* está relacionado com a síndrome de Bruck, doença autossômica recessiva que é caracterizada pela combinação dos sintomas característicos de Osteogênese Imperfeita, associado a contraturas e redução da mobilidade. O fenótipo para a síndrome de Bruck causada por mutações nos genes *FKBP10* e *PLOD2* sugere que a *FKBP65* (codificada pelo *FKBP10*) seja

necessária para a atividade da LH2 (DURAN et al., 2015; PUIG-HERVÁS et al., 2012; VAN DER SLOT et al., 2003).

A biossíntese de moléculas de colágeno envolve várias modificações intracelulares pós -traducionais, seguido de excreção e agregação extracelular das moléculas de colágeno em fibrilas, as quais são posteriormente estabilizadas por ligações cruzadas (VAN DER SLOT et al., 2003).

Os telopeptídeo hidroxilisinas são os precursores de uma série de processos bioquímicos, conhecidas como a rota hidroxiallisina, que estão envolvidas com a formação de ligações cruzadas intermoleculares lisilpiridinolina e hidroxilisilpiridinolina dentro de fibrilas de colágeno. As ligações cruzadas fornecem propriedades de estabilidade e de tração para fibrilas de colágeno. Sendo um passo fundamental na biossíntese do mesmo (HA-VINH et al., 2004).

A lisina (Lis) é o principal resíduo de aminoácido envolvidos em ligações cruzadas de colágeno. As lisil-hidroxilases são responsável pela hidroxilação de resíduos de lisina dentro da sequência de tripla hélice e nas terminações amino e carboxi de telopeptídeos.

Os resíduos de hidroxilisinas no telopeptídeo são convertidas em aldeído hidroxiallisina, que em seguida, reage com um resíduo de Lis ou Hil na tripla hélice formando ligações cruzadas di, tri ou tetra funcional. Estas ligações cruzadas derivadas a partir de resíduos de Hil ou Lis ou a partir de dois resíduos de hidroxilisina são encontrados numa variedade de tecidos conjuntivos, incluindo ossos e a cartilagem (VAN DER SLOT et al., 2003).

#### **2.4.7 - PROTEÍNA SINALIZADORA**

O gene ***WNT1*** (*wingless-type MMTV integration site family, member 1*) está localizado no cromossomo 12q13.12, possui quatro exons e codifica a proteína wnt1 (FAHIMINIYA et al., 2013).

A sinalização de Wnt é essencial para o desenvolvimento ósseo e à homeostase celular, pois ao exercer sua função a proteína induz a diferenciação de osteoblastos, a formação óssea e regula a osteoclastogênese (LAINE et al., 2013).



As proteínas Wnt tem em sua formação 22 conjuntos de resíduos de cisteínas que formam pontes dissulfeto na estrutura quaternária da proteína. Elas são N-glicosiladas e aciladas por adição de ácido palmitato e/ ou palmitoleico em um único resíduo de serina para manter sua atividade quando estiver sendo transportada intracelularmente no processo de secreção (FAHIMINIYA, 2013).

Wnt1 interage com duas proteínas transmembrana, o receptor *frizzled* (FZD) e o co-receptor LRP5. A sinalização induzida por *LRP5/WNT* é necessária para a indução de fosfatase alcalina, um marcador para osteoblastos maduros, que coloca *LRP5/WNT* juntos na via de diferenciação celular. Por meio dessas interações o Wnt1 regula a via Wnt canonical promovendo a fosforilação de beta-catenina fazendo com que a mesma acumule no citoplasma e posteriormente seja transportada para o núcleo onde age como co-ativador dos fatores de transcrição da família TCF/LEF. O gene *SP7* relacionado com a diferenciação de osteoblastos e formação óssea e o gene *ALPL* relacionado com mineralização óssea estão entre os alvos dessa sinalização (PYOTT et al., 2013).

#### 2.4.8 - PROTEÍNA TRASDUTORA

**CREB3L1** (*cAMP responsive element binding protein 3-like 1*) localizado no cromossomo 11q11 é constituído por 13 exons. Em murinos, o gene que apresenta homologia com o de seres humanos codifica *OASIS*, um transdutor de retículo endoplasmático que regula a expressão de pró-colágeno tipo I durante a formação óssea. Em roedores, *OASIS* mostrou ser essencial para a formação óssea ativando a transcrição do gene *COL1A1* e facilitando a secreção de proteínas de matriz (SYMOENS et al., 2013).

Em ratos a porção N-terminal da *OASIS* é translocada para o núcleo onde se liga ao osteoblasto *UPRE* sendo essa a região reguladora do promotor do *COL1A1* causando altos níveis da expressão do pró-colágeno tipo I. A deleção em homozigose do gene acarreta em diminuição nas quantidades do mesmo, sugerindo assim redução de pró-colágeno tipo I na matriz óssea.

## 2.4.9 – PROTEÍNA MODELADORA

O gene prolil 4-hidroxilase, beta polipeptideo (**P4HB**) está localizado no cromossomo 17q25, apresenta 11 exons e codifica a proteína dissulfeto isomerase (PDI). Esta proteína pertence a uma família proteica que auxilia na formação correta de pontes dissulfeto em cadeias polipeptídicas recém-formadas, sendo de extrema importância para a modelagem de estruturas proteicas. Durante a formação do pro-colágeno tipo I ela age como chaperona evitando agregação do mesmo (RAUCH et al., 2015).

A PDI também auxilia a subunidade alfa da prolil 4-hidroxilase (proteína que hidroxila resíduos de prolina ao longo das cadeia de pro-colágeno I) e por essa razão ela também pode ser referida como a subunidade beta prolil 4-hidroxilase (RAUCH et al., 2015).

A PDI é constituída por dois domínios ativos com atividade dissulfeto isomerase que estão localizados na porção C terminal da proteína, dois resíduos de cisteína (Cys397 e Cys400) são peças chaves em sua atividade. Através de programas de modelagem proteica sugere-se que quando esses dois resíduos são alterados há uma interferência na função dissulfeto isomerase no centro ativo da enzima. Não se sabe ao certo, mas acredita-se que a PDI alterada em pacientes com OI afete-os por várias vias diferentes visto que além das funções já mencionadas o acúmulo de PDI no retículo endoplasmático possa ter um efeito tóxico para as células (RAUCH et al., 2015).

## 2.4.10 – PROTEÍNA EXPORTADORA

A proteína Sec24D é codificada pelo gene **SEC24D** composto por 23 exons que está localizado no cromossomo 4q26. Esta proteína tem a função de transportar as cadeias de pró-colágeno tipo I do lúmen do retículo endoplasmático (RE) para o citoplasma. É no retículo endoplasmático, onde a tripla hélice é formada e modificações pós-traducionais são realizadas. Para que a estrutura helicoidal seja exportada são necessária enzimas e acompanhantes. Este transporte é realizado através de vesículas transportadoras que são geradas por um complexo proteico chamado COPII, sendo que dentro desse complexo está a Sec24D. Indivíduos com

alterações no gene SEC24D apresentam problemas na exportação do pró-colágeno e consequentemente ocorre o acúmulo do mesmo no RE. Alterações no gene ainda são observadas em pequenos números e estão restritas a uma população no sudoeste da Alemanha, demonstrando mais um caso de efeito fundador assim como relatado no gene TMEM38B (GARBES, 2015).

#### 2.4.11 – PROTEÍNA MODULADORA

O gene **SPARC** está localizado no cromossomo 5q33.1 e compreende 10 exons. Ele codifica a proteína Sparc que se liga ao colágeno tipo I e outras proteínas no espaço extracelular modulando a interação proteica na matriz extracelular. Além disso, ele também pode se ligar intracelularmente a mesma molécula agindo como uma chaperona. Um polimorfismo já descrito na literatura na região 3'UTR influencia no acúmulo de Sparc no osso e foi associada a problemas na formação óssea. Foi observado que crianças com OI apresente síntese reduzida de Sparc em osteoblastos primários. Arg166 e Glu263 são dois resíduos importantes na proteína moduladora, eles são responsáveis por formar uma ponte salina intramolecular entre o colágeno tipo I e a Sparc. Esta ponte é essencial para a manutenção das estruturas fibrilares do colágeno (MENDOZA-LONDONO,2015).

#### 2.4.12 – PROTEÍNA DE MONTAGEM

O gene **PLS3** é composto de 16 exons, está localizado no cromossomo Xq23 e codifica a proteína Plastina 3 que também pode ser chamada de T-plastina. Esta proteína é expressa ubiquamente em tecidos sólidos e faz parte de uma família proteica que participa da montagem e desmontagem do citoesqueleto de actina. A plastina 3, especificamente, interage com a actina globular ou filamentos. Sua função em tecidos ósseos ainda não é bem conhecida e o fenótipo de indivíduos com mutações em *PLS3* não foi detalhado na literatura (FAHIMINIYA, 2014).

Atualmente foram descritos 16 genes de responsáveis por casos de OI associados com o padrão de herança recessiva. Em alguns destes genes foram encontradas

alterações em várias populações demonstrando uma ampla distribuição mundial. Em outros genes as mutações foram descritas em populações restritas, devido a efeito fundador. Em função do grande número de genes mutados que causam a Osteogênese Imperfeita o estabelecimento do diagnóstico molecular é de grande dificuldade. Assim, são necessárias novas pesquisas que auxiliem na caracterização do padrão de mutações em genes relacionados com OI de diferentes populações inclusive na população brasileira.

### **3 – OBJETIVOS**

#### **3.1 - Objetivo Geral:**

Caracterizar o padrão de mutações em genes relacionados com a Osteogênese Imperfeita de padrão de herança autossômica recessiva no Espírito Santo.

### 3.2 - Objetivos específicos:

- Realizar o sequenciamento direto por meio de todas as regiões codificantes do gene *LEPRE1* do DNA de dois pacientes não consanguíneos onde uma mutação previamente identificada;
- Caracterizar o padrão de mutações nos genes *PPIB*, *SP7*, *FKBP10*, *SERPINH1*, *CRTAP*, *PPIB* e *LEPRE1* em pacientes com OI do Espírito;
- Caracterizar o padrão de mutações no gene *WNT1* em cinco pacientes com Osteogênese Imperfeita do ES;

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 PACIENTES**

As amostras selecionadas para esse trabalho foram provenientes de pacientes atendidos no Hospital Infantil Estadual Nossa Senhora da Glória, Vitória/ES, centro de referência em tratamento para Osteogênese Imperfeita, dentre as quais foram selecionados os pacientes que apresentavam diagnóstico clínico para a doença.

A amostra é composta de 22 pacientes não consanguíneos, sendo cinco casos familiares (figura 5) e 16 casos isolados. Em um dos casos não obtivemos informações sobre o heredograma do paciente. Estão presentes na amostra 11 indivíduos do sexo masculino e 11 do sexo feminino, sendo a mediana da idade 15 anos (Tabela 4).

Aproximadamente 41% dos pacientes foram classificados como Osteogênese Imperfeita Tipo I (forma leve da doença), 36% como Tipo IV (moderada) e 23% são caracterizados como Tipo III (Quadro clínico grave).

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética do HINSG, Vitória/ES (Protocolo de número 37/2005 e 60/2009). Todos os pacientes ou seus responsáveis legais assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Tabela 3: Informações referentes aos pacientes.

Pacientes	Sexo*	Idade	Familiar	Classificação
P.1	M	17 anos	Não	Tipo I
P.2	M	17 anos	Não	Tipo IV
P.3	M	15 anos	Não	Tipo I
P.4	M	16 anos	Não	Tipo IV
P.5	M	15 anos	Não	Tipo III
P.6	F	24 anos	Sim	Tipo III
P.7	F	10 anos	Não	Tipo IV
P.8	M	12 anos	Não	Tipo III
P.9	M	11 anos	Sim	Tipo I
P.10	F	11 anos	Não	Tipo IV
P.11	F	11 anos	Não	Tipo III
P.12	F	8 anos	Não	Tipo IV
P.13	F	13 anos	Não	Tipo IV
P.14	F	18 anos	Não	Tipo I
P.15	F	9 anos	Sim	Tipo III
P.16	F	13 anos	Não	Tipo IV
P.17	M	17anos	Não	Tipo I
P.18	M	18 anos	Sim	Tipo I
P.19	M	8 anos	Sim	Tipo I
P.20	M	15 anos	SI	Tipo I
P.21	F	7 anos	Não	Tipo I
P.22	F	6 anos	Não	Tipo IV

\*F = feminino, M = masculino e SI = sem informação.

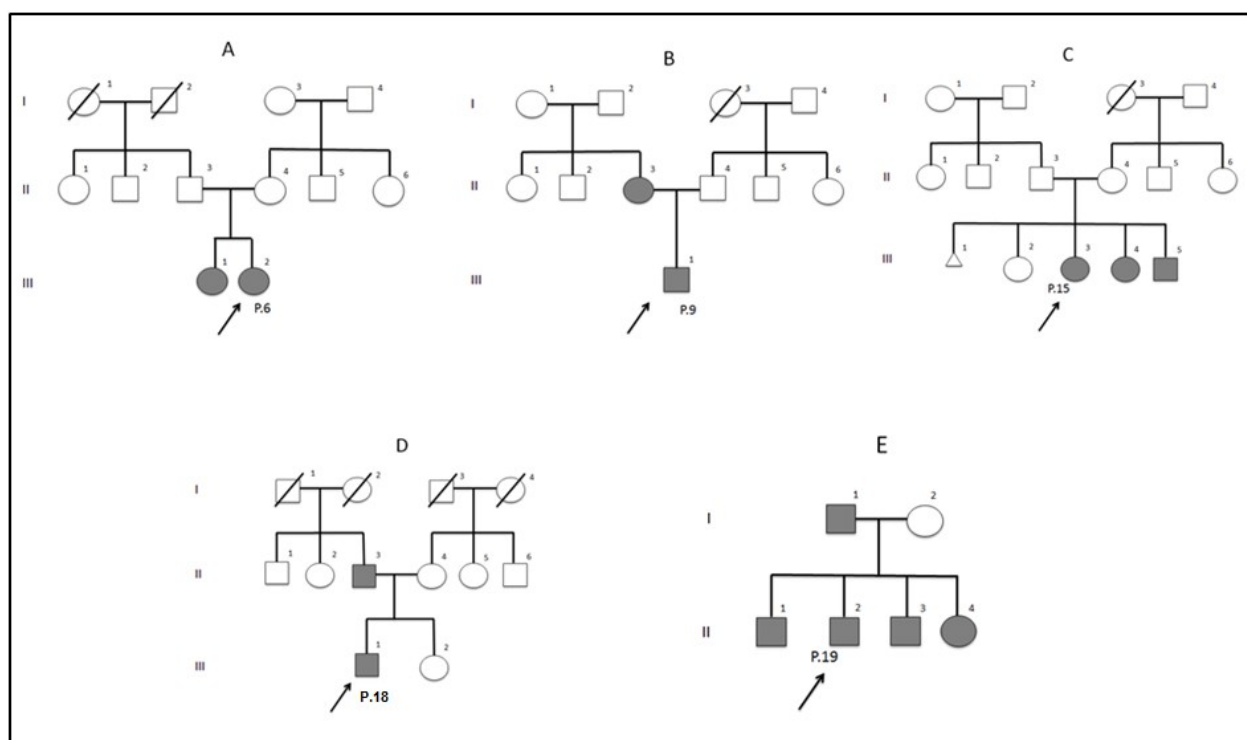


Figura 5: Heredograma de casos familiares. Observação:  $\triangle$  = aborto



## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Extração de DNA

Foi coletado sangue periférico de pacientes previamente diagnosticados clínica e radiologicamente. Após a coleta de 5ml de sangue as amostras foram encaminhadas ao laboratório e posteriormente foi extraído o DNA de acordo com a metodologia de Miller e colaboradores (1988) com as devidas modificações.

#### **PROTOCOLO:**

- a) Passar o sangue para um tubo falcon de 15mL;
- b) Completar o volume para 13mL com solução lise ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  1550mM;  $\text{KHCO}_3$  100Mm; EDTA 10Mm Ph 7,4), homogeneizando em seguida;
- c) Colocar os tubos no gelo durante 30 minutos;
- d) Centrifugar a amostra por 16 minutos a 1800 rpm;
- e) Desprezar o sobrenadante e lavar o precipitado em 5mL de solução de lise (2x);
- f) Ressuspender o sobrenadante delicadamente, após colocar a solução de lise;
- g) Centrifugar por 6 minutos a 1800rpm; Repetir essa etapa 2X;
- h) Desprezar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 1,5mL de Nucleolysis;
- i) Adicionar 35 $\mu\text{L}$  de proteinase K pela parede do tubo e misturar;
- j) Adicionar 200 $\mu\text{L}$  de SDS 10% pela parede do tubo;
- k) Homogeneizar e incubar os tubos a 37°C por 24 horas.
- l) Após a incubação, adicionar 0,5mL de NaCl 6M e agitar o tubo vigorosamente até ficar com aspecto leitoso;
- m) Centrifugar por 20 minutos a 2500rpm;
- n) Transferir o sobrenadante para tubo falcon limpo e identificado;
- o) Centrifugar por 20 minutos a 2500rpm;
- p) Transferir o sobrenadante para um tubo de vidro;

- q) Adicionar etanol absoluto no volume de 2X do sobrenadante, verter o tubo de vidro vagarosamente;
- r) Coletar o DNA com o capilar de vidro com a extremidade soldada
- s) lavar o mesmo 3X no álcool 70%;
- t) Colocar o DNA preso ao capilar em 200µL de TE-4 (10mM Tris-HCL Ph 8,0; 100µM EDTA pH 7,4) até o DNA dissolver. Depois, descartar o capilar;
- u) Incubar a 65°C por 30 minutos, para eliminar contaminação por DNase;
- v) Armazenar as amostras em geladeira a 4 graus Celsius.

## 4.2.2 Amplificação do DNA

### 4.2.2.1 Gene *LEPRE1*

Para o sequenciamento direto pela metodologia de sanger do gene *LEPRE1* foram utilizados *primers*, referentes aos 15 exons componentes do gene *LEPRE1*, usando como referência a sequência do gene do NCBI (Quadro 1).

O DNA foi amplificado a partir do material genético extraído através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguindo padronizações específicas para cada exon (Quadros 2 e 3). Essa etapa do trabalho foi feita em colaboração com as pesquisadoras Clara Barbirato e Geise de Aguiar do Laboratório de Genética Humana e Molecular do Departamento de Biologia da UFES.

Quadro 1: Primers utilizados para a amplificação das partes codificantes do gene *LEPRE1*.

EXO N	EXTENSÃO DO FRAGMENTO (PB)	PRIME R	SEQUÊNCIA DO PRIMER (5' 3')
1a	378	<i>Forward</i>	GGGCTGACTGAAAGGAAAAG
		<i>Reverse</i>	AGCGCAGGCGAAGGGCGC
1b	359	<i>Forward</i>	GGTCCTGAGCATGGAACG
		<i>Reverse</i>	CAACACTCCTCTCCCCAGAA
2*	389	<i>Forward</i>	CTCAGGGAGGCAGGGATT
		<i>Reverse</i>	AGTCCGGGAATTTGAGGTTAC

3*	390	<i>Forward</i>	CCCCTTTCCATCCATAACC
		<i>Reverse</i>	GAGTCCCCATTTATATTATCA
4	378	<i>Forward</i>	GGGGACTCTTCACCCTCATT
		<i>Reverse</i>	AAGCCAAACACCTTGAGGAA
5	297	<i>Forward</i>	GGTCCCTGGTGCTAGGATTT
		<i>Reverse</i>	GCCTACTCCCCTCTGCTACC
6	347	<i>Forward</i>	CTGGGGAACAGACAGAGAGC
		<i>Reverse</i>	CTCAGCCTCCAGCAAGTTTT
7*	239	<i>Forward</i>	GGCAGCTAGAAGGGACTTAGA
		<i>Reverse</i>	ATGCAGTTTCTTCAAGGTCCTC
8	394	<i>Forward</i>	AAGCACTTGAGGCTTCCTGA
		<i>Reverse</i>	TCCACTGAACTTGCACCCTA
9*	359	<i>Forward</i>	AAAATGACCTAGCGGGAGA
		<i>Reverse</i>	GGAAGAGGAAGGCGAAGGCTA C
10*	347	<i>Forward</i>	GTGGTAGCCTTCGCCTTC
		<i>Reverse</i>	AACATAACTCATCCTCGCTTCC
11	378	<i>Forward</i>	AGGTCCCTTCCACAACACAT
		<i>Reverse</i>	ACATTGGTTCCCCAACTGAA
12	332	<i>Forward</i>	CATTGGGCATTCCGTAGACT
		<i>Reverse</i>	CCAGTGTGTGTGTGCTAGGG
13	300	<i>Forward</i>	CACACAAAGCCACCCTCCT
		<i>Reverse</i>	CAAGGGTACCGCCCACTG
14	388	<i>Forward</i>	GGGAAGCCATACTGAAGAGC
		<i>Reverse</i>	GTGTCCCAAGTGCTCCTTTC
15A	384	<i>Forward</i>	CCTGGGAAGTAGCAGCTGAG
		<i>Reverse</i>	GCACCATGTAGAAGGCTGTG
15B	348	<i>Forward</i>	TGACTAGACCCATGGAGAGGA
		<i>Reverse</i>	AGACCTCTGGGACAGAATGG

\*Primers descritos por BALDRIDGE e colaboradores (2008). Os demais *primers* foram desenhados por (Barbirato, 2010).

Quadro 2: Padronização referente às etapas de amplificação do DNA

ETAPAS DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA						
Exon	Desnaturação Inicial	Hibridização			Extensão Final	Ciclos
		Desnaturação	Anelamento	Extensão		
<b>1a</b>	95°C/10min	95°C/45seg	53°C/30seg	72°C/45seg	72°C/10min	40
<b>1b</b>	95°C/10min	95°C/45seg	53°C/45seg	72°C/45seg	72°C/7min	35
<b>2</b>	95°C/5min	95°C/30seg	64°C/20 seg	72°C/30seg	72°C/7min	27
<b>3</b>	95°C/5min	95°C/30seg	60°C/20seg	72°C/30seg	72°C/7min	35
<b>4</b>	95°C/5min	95°C/30seg	65°C/20seg	72°C/30seg	72°C/7min	30
<b>5</b>	95°C/5min	95°C/30seg	66°C/20seg	72°C/30seg	72°C/7min	26
<b>6</b>	95°C/5min	95°C/30seg	67°C/30seg	72°C/30seg	72°C/7min	35
<b>7</b>	95°C/5min	95°C/30seg	65°C/30seg	72°C/30seg	72°C/7min	30
<b>8</b>	95°C/5min	95°C/30seg	58°C/20seg	72°C/30seg	72°C/7min	30
<b>9</b>	95°C/5min	95°C/30seg	65°C/20seg	72°C/30seg	72°C/7min	36
<b>10</b>	95°C/5min	95°C/30seg	65°C/30seg	72°C/30seg	72°C/7min	35
<b>11</b>	95°C/5min	95°C/30seg	64°C/20seg	72°C/30seg	72°C/7min	28
<b>12</b>	95°C/5min	95°C/30seg	68°C/30seg	72°C/30seg	72°C/7min	35
<b>13</b>	95°C/5min	95°C/30seg	63°C/20seg	72°C/30seg	72°C/7min	30
<b>14</b>	95°C/5min	95°C/30seg	60°C/20seg	72°C/30seg	72°C/7min	30
<b>15a</b>	95°C/5min	95°C/30seg	60°C/20seg	72°C/30seg	72°C/7min	30
<b>15b</b>	95°C/5min	95°C/30seg	60°C/20seg	72°C/30seg	72°C/7min	30

Quadro 3: Reagentes presentes na reação de amplificação do DNA

REAGENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR Buffer	1,0µL	1x
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0,3µL	1,5mM
dNTP 10mM	0,2µL	0,2mM
Primer Forward 10µM	0,4µL	0,4mM
Primer reverse 10µM	0,4µL	0,4mM
Tag DNA Polimerase 5U/µL	0,1µL	1U
DNA 20ng/µL	1,0µL	1,6ng/ µL
H <sub>2</sub> O	6,6µL	

#### 4.2.2.2 Gene *WNT1*

Foram desenhados os *primers* referentes aos quatro exons componentes do gene *WNT1*, usando com referência a sequência do gene do NCBI (NCBI Reference Sequence: NG\_033141.1 ) (Quadro 4) na plataforma online *Primer3web* versão 4.0.0 (<http://primer3.ut.ee/>). O DNA dos pacientes analisados foi amplificado a partir do material genético extraído por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguindo padronizações específicas para cada exon (Quadro 5).

Quadro 4: Primers utilizados para a amplificação das sequências codificantes do gene *WNT1*

EXO N	EXTENSÃO DO FRAGMENTO (PB)	PRIME R	SEQUÊNCIA DO PRIMER (5'3')
1	493	<i>Forward</i>	CCATTGTCTGCGCCCCTAA
		<i>Reverse</i>	GGCAGACGGATCCCAGAG
2	477	<i>Forward</i>	TTCTCTCCAGCCACATACCC
		<i>Reverse</i>	GGTTGATTGTGTGACCCTCC
3	413	<i>Forward</i>	TTCATGAGGGTGCTGGCC
		<i>Reverse</i>	CCTTATCTCACCGACCGTCA
4a	345	<i>Forward</i>	CAGTGTCTGGGAGGGTGAC
		<i>Reverse</i>	TGTACGTGCAGAAGTTGGG
4b	355	<i>Forward</i>	GAAGACCCGGCCCAAAA
		<i>Reverse</i>	TGAGTGCTAGCGAGTCTGTT
4c	424	<i>Forward</i>	TGCACGAGTGTCTGTGAGG
		<i>Reverse</i>	CGGAGAAAACGCAGGACAA A
4d	344	<i>Forward</i>	GTCATTCTGCCTGCTCCATC
		<i>Reverse</i>	ACACACTGATGAGGAGGCA G
4e	450	<i>Forward</i>	GTCGTGGAGCCATTGAACAG
		<i>Reverse</i>	AAAGGGGAGGATAGGGGAC A

Quadro 5: Padronização referente às etapas de amplificação do DNA.

ETAPAS DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA
-------------------------------

Exo n	Desnaturação Inicial	Hibridização			Extensão Final	Ciclos
		Desnaturação	Anelamento	Extensão		
1	95°C/5min	95°C/30seg	65°C/30seg	72°C/30seg	72°C/10min	25
2	95°C/5min	95°C/30seg	65°C/30seg	72°C/30seg	72°C/10min	25
3	95°C/5min	95°C/30seg	63°C/30seg	72°C/30seg	72°C/10min	28
4a	95°C/5min	95°C/30seg	59°C/30seg	72°C/30seg	72°C/10min	28
4b	95°C/5min	95°C/30seg	59°C/30seg	72°C/30seg	72°C/10min	28
4c	95°C/5min	95°C/30seg	59°C/30seg	72°C/30seg	72°C/10min	28
4d	95°C/5min	95°C/30seg	63°C/30seg	72°C/30seg	72°C/10min	28
4e	95°C/5min	95°C/30seg	63°C/30seg	72°C/30seg	72°C/10min	28

Para os genes *CRTAP*, *PPIB*, *FKBP10*, *SP7*, *SERPINF1* não houve necessidade de desenhar os primers, pois a técnica de NGS utilizada para estudo não utiliza primers tradicionalmente utilizados na reação de PCR.

#### 4.2.3 ELETROFORESE PARA VERIFICAR A AMPLIFICAÇÃO DO DNA

Cerca de 5µL amostras amplificadas misturadas com 2µL de corante foram aplicadas em gel de poliacrilamida 6% no qual continha 7,5mL de acrilamida, 5mL de TBE 10x, 325µL de APS 10%, 35µL de TEMED e H<sub>2</sub>O destilada para volume final de 50mL; e corridas por uma hora e trinta minutos a 240 volts. Após a corrida os géis passaram por uma coloração em prata.

#### 4.2.4 SEQUENCIAMENTO

Confirmada a amplificação das amostras as mesmas foram preparadas para serem sequenciadas a partir do seguinte protocolo de acordo com o fabricante:

1- Para a purificação do produto de PCR foi feita uma reação em um tubo de 0,2 µL:

4µL de produto de PCR

1µL de exopro star

1µL de fosfatase alcalina

Levar ao termociclador a amostra seguindo a seguinte condição:

37°C por 15 min

80°C por 15min

**2** – Para a reação de sequenciamento foi feita a reação em um novo tubo de ensaio:

4μL da amostra previamente purificada

0,32μL de primer

1,68μL de água

3,5μL de buffer (do *big dye*)

0,5μL de *big dye*

**3** – Levar ao termociclador

96°C - 1min

96°C - 10 seg	} 25 X
50°C - 5 seg	
60°C - 4 min	

4°C <sup>∞</sup>

**4** – Protocolos para precipitação com etano/EDTA/acetato de sódio (adaptado do protocolo do *BigDye*)

a) Ao conteúdo da reação de sequenciamento (10μL), adicionar:

2 μL – Acetato de sódio 3M pH 5,2  
2 μL – EDTA 125mM pH 8,0

b) Vortexar rapidamente;

c) Adicionar 50 μL de etanol 100%;

d) Vortexar rapidamente;

e) Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos;

f) Centrifugar por 20 minutos a 14 000 rpm;

g) Cuidadosamente aspirar o sobrenadante com uma pipeta e descartá-lo;

h) Adicionar ao pellet 250 μL de etanol 70%;

- i) Vortexar rapidamente;
- j) Centrifugar por 10 minutos a 14 000 rpm;
- l) Cuidadosamente aspirar o sobrenadante com um pipeta e descartá-lo;
- m) Repetir os passos j e l;
- n) Secar as amostras em termociclador por 3min a 80°C;
- o) Armazenar em geladeira e protegido da luz até o processamento.

Após o preparo as amostras foram enviadas para o Instituto de Química da Universidade de São Paulo para serem sequenciadas. As análises foram feitas baseando-se nas sequências referência de cada gene sequenciado, encontrada online em Ensembl Genome Browser <<http://www.ensembl.org/index.html>> e as alterações quando encontradas foram comparadas com o banco de dados online da Osteogênese Imperfeita <<http://www.le.ac.uk/ge/collagen>>.

#### 4.2.4 NEXT GENERATION SEQUENCING

Para o *Next Generation Sequencing* (NGS) foram utilizado 5uL de DNA a 100 ug/uL dos pacientes. A plataforma de captura de genes utilizada continha 460 genes nos quais estavam incluídos os genes de Osteogênese Imperfeita.

A partir do DNA dos pacientes foi feito o preparo das bibliotecas customizadas no painel *Nextera – Illumina*. Após a amplificação da biblioteca, a mesma foi validada por meio de dois métodos utilizados para quantificar e verificar o tamanho da biblioteca. Primeiro foi feito por *Bioanalyzer* com o Kit *High Sensivity DNA kit* e posteriormente por Q-PCR com o kit *KAPA Library Quantification Kit* no equipamento *Real Time LighCycler* da Roche, conforme recomendado pelo próprio fabricante.

Validadas as amostras o sequenciamento se deu através do equipamento *MiSeq Illumina* com 600 ciclos (2x300) e cobertura média de 120X para as 22 amostras.

No que se refere à análise de dados, para encontrar *SNPs* e *indels* foi utilizado o *BWA* para realizar o alinhamento das sequencias e para o realinhamento das mesma utilizou-se o *Picard* e o *GATK* para gerar a lista de *SNPs*.



Como controles foram utilizados dados genéticos de indivíduos fornecidos pelo grupo colaborador da USP.

Após a análise das amostras, quando encontradas alguma alteração que estava predita como patogênica, tais amostras foram sequenciadas pela técnica de Sanger servindo então como mais uma validação do resultado.

Esta etapa do trabalho foi feita em colaboração do laboratório de Genética do Desenvolvimento e o Genoma Humano da Universidade de São Paulo com a técnica Meire Agüena sob a supervisão das professoras Maria Rita Passos-Bueno e Mayana Zatz.

#### **4.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A SELEÇÃO DAS AMOSTRAS**

Estudos prévios identificaram uma mutação no gene *LEPRE1* em dois pacientes não consanguíneos que apresentavam Osteogênese Imperfeita, provavelmente, casos de heterozigose composta. A segunda mutação patogênica não tinha sido identificada. Assim, no presente trabalho, estes dois pacientes foram selecionados para a realização de sequenciamento direto de todo o gene *LEPRE1* pela metodologia de Sanger.

O total de 22 pacientes com diagnóstico clínico de OI foram selecionados para avaliação dos genes *PPIB*, *SP7*, *FKBP10*, *SERPINH1*, *CRTAP*, *PPIB* e *LEPRE1* pelo método de NGS.

A análise do gene *WNT1* foi realizada após obtenção dos resultados de NGS que identificaram mutações patogênicas em 17 dos 22 pacientes. Os casos nos quais as mutações foram identificadas de forma conclusiva foram excluídos da análise do gene *WNT1*. Assim, foram estudados cinco pacientes (P.1, P.5, P.9, P.10 e P.15) para o gene *WNT1*.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 SEQUENCIAMENTO DIRETO DO GENE *LEPRE1*

Não foi encontrada nenhuma outra mutação no gene *LEPRE1* neste dois pacientes. A presente pesquisa confirmou a existência das duas mutações previamente identificadas (figura 6).

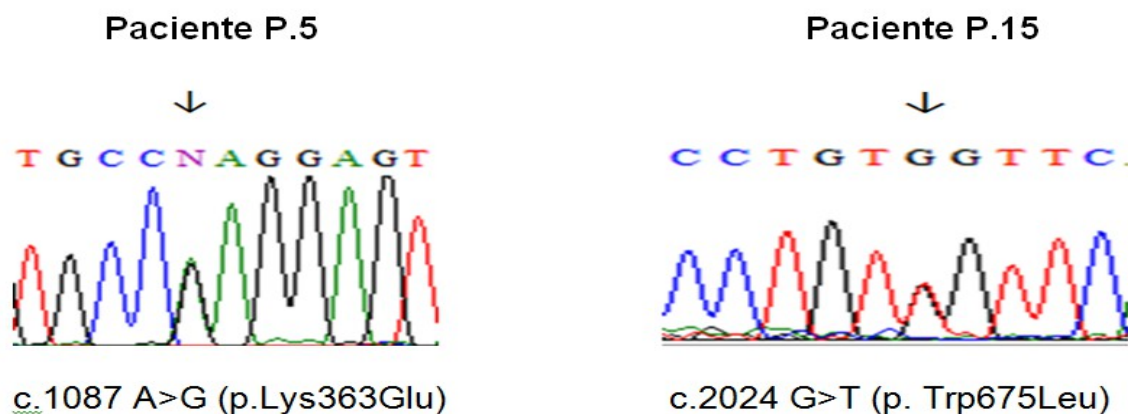


Figura 6: Sequenciamento das alterações encontradas nos pacientes P.5 e P.15

### 5.2 NEXT GENERATION SEQUENCING

Para a análise dos dados foram utilizados parâmetros de filtragem na busca de variantes com frequência menor ou igual a 0,01% na amostra controle com o objetivo de encontrar alterações raras, potencialmente patogênicas.

Foram identificadas mutações nos genes *COL1A1* e *COL1A2* em 17 dos 22 pacientes da amostra. Estes pacientes foram posteriormente excluídos das análises posteriores. Foram identificadas mutações patogênicas nos genes para OI recessiva em cinco dos 22 pacientes (Tabela 10). Não foi identificada mutação em nenhum dos genes estudados no paciente P.1.

### 5.2.1 – NGS DO GENE *LEPRE1*

As duas alterações mencionadas anteriormente foram mais uma vez encontradas, porém não foi observada mais nenhuma outra mutação na extensão codificante do gene em questão.

### 5.2.2 – NGS DOS GENES *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINH1* e *SP7*

Na análise dos pacientes não foi encontrada nenhuma alteração potencialmente patogênica em toda a extensão dos genes nos pacientes P.1, P.5, P.9 e P.15

No gene *CRTAP* foram observadas três trocas de nucleotídeos: C>T, C>T e A>C, localizadas na região 3'UTR em heterozigose nos pacientes P.15, P.10 e P.13, respectivamente. Observou-se no gene *PPIB* e a alteração sinônima no exon 1 c.C63A (p.S215) no paciente P.15. No gene *SERPINH1* a troca de bases G>A, foi observada na região 5'UTR do paciente P.5. Não foi encontrada nenhuma alteração genética no gene *SP7*.

### 5.2.3 - NGS DO GENE *FKBP10*

Na análise dos dados do gene *FKBP10* foram encontradas quatro mutações. Duas delas do tipo *frameshift* detectadas em homozigose, a duplicação c.825dupC (p.L275fs), exon 5, identificada no paciente P.7 e a alteração c.15dupC (p.G5fs), exon 1, detectada no paciente P.13. No paciente P.10 foram observadas duas alterações distintas em heterozigose composta, a mutação *missense* c.A179C (p.Q60P), exon 1, e a alteração no sítio de *splicing* no intron 6 (figura 7).

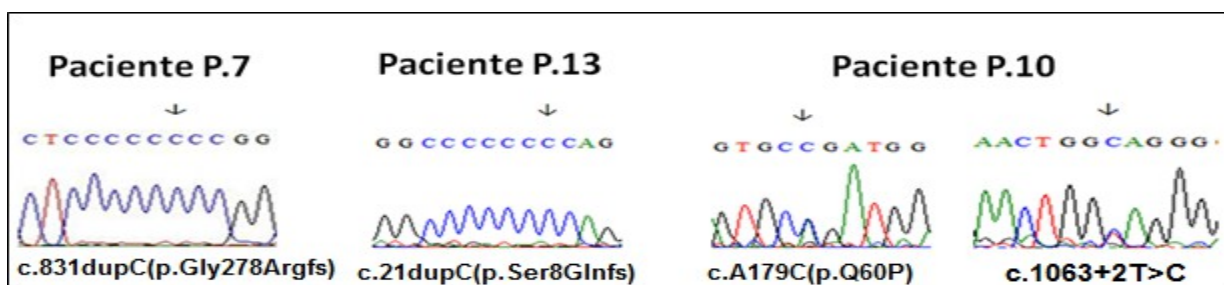


Figure 7: Sequenciamento das alterações encontradas nos pacientes P.7, P.10 e P.13

Tabela 5: Informações referentes às alterações encontradas.

Paciente	Gene	Mutação	Estado	Exon/ Intron	Tipo de OI	Histórico Familiar	Tipo de Mutação
P.5	LEPRE1	c.1087A>G (p.Lys363Glu)	Heterozigose	Exon 6	III	Não	<i>Missense</i>
P.15	<i>LEPRE</i> 1	c.2024G>T (p.Trp675Leu)	Heterozigose	Exon 14	III	Sim	<i>Missense</i>
P.7	<i>FKBP10</i>	c.831dupC (Gly278Argfs)	Homozigose	Exon 5	III	Não	<i>frameshift</i>
P.10	<i>FKBP10</i>	c.1063+2T>C	Heterozigose	Intron 6	IV	Não	<i>Sítio de Splicing</i>
P.10	<i>FKBP10</i>	c.A179C (p.Q60P)	Heterozigose	Exon 1	IV	Não	<i>Missense</i>
P.13	<i>FKBP10</i>	c.21dupC (Ser8Glnfs)	Homozigose	Exon 1	IV	Não	<i>frameshift</i>

### 5.3 SEQUENCIAMENTO DIRETO DO GENE *WNT1*

Foram sequenciados os quatro exons do referido gene em cinco pacientes que não apresentavam mutações previamente identificadas nos genes analisados. Não foi encontrada nenhuma alteração nas regiões avaliadas. Contudo, o sequenciamento da porção dos exon 3 e 4a, foi inconclusivo em dois pacientes e será repetido posteriormente para fins de publicação dos resultados.

## 6 – DISCUSSÃO

A Osteogênese Imperfeita é uma doença caracterizada por fraturas recorrentes que apresenta ampla heterogeneidade genética. No presente trabalho foram analisados os genes *LEPRE1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SP7*, *SERPINF1*, *FKBP10* e *WNT1* de 22 pacientes não consanguíneos que apresentavam diagnóstico clínico de Osteogênese Imperfeita. Foram identificadas mutações em 20% da amostra (5/22). As mutações detectadas estavam localizadas nos genes *LEPRE1* e *FKBP10*.

Foram confirmadas as mutações *missense* c.1087 a>g (p.lys363glu) e c.2024 g>t (p.trp675leu) em heterozigose no gene *LEPRE1* em dois casos (P.5 e P.15). Estes pacientes apresentam OI tipo III (forma grave), com características clínicas diversificadas como múltiplas fraturas ao longo da vida, deformidade óssea e deambulação comprometida. De acordo com a literatura mutações neste gene estão relacionadas com casos graves ou letais de Osteogênese Imperfeita (WILLAET et al., 2009; Wayne et al., 2007; WEIZHONG et al., 2009; MARINI et al., 2009). Enquanto o paciente P.5 é um caso isolado, o paciente P.15 possui outros familiares portadores da doença. Os pais de P.15 não são afetados, contudo, dois dos seus três irmãos apresentam sintomas de Osteogênese Imperfeita. Os pais de P.15 relataram um caso de aborto. De acordo com a classificação atual, indivíduos portadores de mutações no gene *LEPRE1* são classificados como OI tipo VIII e apresentam sintomas graves ou letais de OI (FRATZL-ZELMAN et al., 2015).

Como o gene *LEPRE1* está relacionado com padrão de herança autossômico recessivo em OI, é preciso que existam duas mutações ao longo de sua sequência. Foram identificadas apenas uma das mutações nas amostras de DNA dos pacientes P.5 e P.15, possivelmente um caso de heterozigose composta. No presente trabalho foi realizado sequenciamento direto (metodologia de Sanger) de todas as porções codificantes do gene. Também foi realizado sequenciamento por NGS, método que fornece sequenciamento com relevante cobertura da porção codificante do gene. Contudo, mesmo após todos estes esforços não foi encontrada nenhuma outra alteração do gene *LEPRE1* nos dois pacientes.

Os resultados de sequenciamento obtidos nesta pesquisa sugerem que a técnica de triagem de mutações por SSCP apresentou sensibilidade para o gene estudado. Assim, a escolha da metodologia de SSCP para estudo do gene *LEPRE1* possui confiabilidade para análise de mutações.

A segunda alteração genética destes pacientes, ainda não identificada, pode estar localizada em regiões que englobam variação no número de cópias (*Copy Number Variant-CNV*) as quais não são detectadas pelas técnicas utilizadas neste trabalho. Outra hipótese que explicaria o fato de não termos detectado a segunda mutação destes pacientes se baseia na localização da mutação. A segunda mutação pode estar localizada em porções não codificantes do gene estudado, como regiões reguladoras intrônicas ou regiões promotoras do gene. Estas regiões não foram analisadas na pesquisa em questão.

Não detectamos mutações patogênicas nestes dois pacientes para os genes *CRTAP*, *PPIB*, *SP7*, *SERPINH1*, *FKBP10*, por NGS e no gene *WNT1* após análise do sequenciamento de Sanger. Assim, existe relevante possibilidade destas mutações no gene *LEPRE1* serem patogênicas e a segunda mutação não ter sido detectada nos estudos realizados. Contudo, como a segunda mutação não foi identificada nos dois casos, não podemos excluir a possibilidade destas alterações serem variantes genéticas raras não patogênicas, casos de dominância para o gene *LEPRE1*.

Foram identificadas mutações no gene *FKBP10* em três pacientes não consanguíneos da amostra. Os pacientes P.7 e P.13 são portadores em homozigose de duplicações distintas no gene *FKBP10*: c.831dupC (exon 5) e c.21dupC (exon 1), respectivamente. Estas alterações estão descritas na literatura (<http://www.le.ac.uk/ge/collagen>).

Foram identificadas duas mutações em heterozigose composta no gene *FKBP10* no paciente P.10, a mutação *missense* c.A179C (exon 1) e a mutação de sítio de *splicing* c.1063+2T>C (intron 6). Nenhuma das duas alterações foram previamente descritas na literatura (<http://www.le.ac.uk/ge/collagen>).

Os pacientes P.7, P.10 E P.13 apresentam sintomas de OI com gravidade moderada. Mutações no gene *FKBP10* foram descritos em pacientes com Quadro clínico leve

com progressivo agravamento da doença (ALANAY et al., 2010; BARNES et al., 2012; STEINLEIN et al., 2011; VENTURI et al., 2012). Neste trabalho os pacientes portadores de mutações em *FKBP10* apresentam características de gravidade moderada, como deformidade óssea, deambulação comprometida e número variado de fraturas após o nascimento, como nos pacientes descritos na literatura (VENTURI et al., 2012).

De acordo com a classificação atual, que se baseia no gene mutado, pacientes portadores de mutações no gene *FKBP10* são classificados como OI tipo XI e apresentam deformidades de moderada a graves (BARNES et al., 2012). Além disto, os pacientes deste tipo de OI podem apresentar contraturas congênitas, característica também observadas na Síndrome de Bruck, doença que possui características semelhantes as da OI.

Não foram identificadas mutações patogênicas nos genes *PPIB*, *CRTAP*, *SERPINH1*, *SP7* e *WNT1*.

Com base nos resultados encontrados, podemos destacar que os genes com maior probabilidade de identificarmos alterações na população estudada são os genes *LEPRE1* e *FKBP10* e que mutações nos genes *PPIB*, *CRTAP*, *SERPINH1*, *SP7* e *WNT1* são raras e não contribuem com as formas dominantes e recessivas na população do Espírito Santo.

A caracterização do padrão de mutações dos genes associados com Osteogênese Imperfeita em populações distintas pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias de diagnóstico molecular da doença, contribuindo para melhorar o aconselhamento genético das famílias e prevenir novos casos na população.

## 7 – CONCLUSÃO

A análise de sete genes (*LEPRE1*, *FKBP10*, *PPIB*, *CRTAP*, *SP7*, *SERPINH1* e *WNT1*) associados à possível herança autossômica recessiva de pacientes com OI do Espírito Santo identificou mutações em 15% (5/22) da amostra. Mutações no gene *LEPRE1* foram observadas em dois pacientes e no gene *FKBP10* foram observadas mutações em três pacientes da amostra. Não foram identificadas mutações patogênicas nos genes *PPIB*, *CRTAP*, *SP7*, *SERPINF1* e *WNT1*. Os resultados desta pesquisa sugerem que a maioria das variantes genéticas patogênicas encontradas em pacientes com OI de padrão autossômico recessivo do ES estão localizadas nos genes *LEPRE1* e *FKBP10*. A caracterização do padrão de mutações em genes relacionados com OI em populações distintas podem melhorar nossos conhecimentos sobre a distribuição de mutações em OI e auxiliar no desenvolvimento de estratégias moleculares para o diagnóstico genético da doença.



## 8 – REFERÊNCIAS:

- ALANAY Y., et al. Mutations in the Gene Encoding the RER Protein FKBP65 Cause Autosomal-Recessive Osteogênese Imperfeita. *The American Journal of Human Genetics*. v. 86. p. 551–559. April 9, 2010.
- ASHARANI P.V., et al. Attenuated BMP1 function compromises osteogenesis, leading to bone fragility in humans and zebrafish. *The American Journal of Human Genetics*. v.90, p.661–674. 2012.
- BALDRIDGE D., et al. CRTAP and LEPRE1 Mutations in Recessive Osteogênese Imperfeita. *Human Mutation*. v.29(12), p.1435-1442. 2009.
- BALJET B. Willem Vrolik als teratoloog. *Ned Tijdschr Geneesk*. v.128, p. 1530-1534. 1984.
- BALJET B. Aspects of the history of Osteogênese Imperfeita (Vrolik's syndrome) *Ann Anat*. v. 184. p. 1-7. 2002.
- BARBIRATO, C. F. F. Investigação de mutações no gene LEPRE1 em pacientes com Osteogênese Imperfeita no Espírito Santo. 2010. 130 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo. 2010.
- BARNES A. M., et al. Lack of Cyclophilin B in Osteogênese Imperfeita with Normal Collagen Folding. *The New England Journal of Medicine*. v.362. p.521-528. 2010.
- BARNES A. M., et al. Absence of FKBP10 in Recessive Type XI Osteogênese Imperfeita Leads to Diminished Collagen Cross-Linking and Reduced Collagen Deposition in Extracellular Matrix. *HUMAN MUTATION*. v. 33. n. 11. p. 1589–1598. 2012.
- BARNES A. M., et al. Kuskokwim Syndrome, a Recessive Congenital Contracture Disorder, Extends the Phenotype of FKBP10 Mutations. *HUMAN MUTATION*. v. 34, n. 9, p. 1279–1288. 2013.
- BASEL D., et al. Osteogênese Imperfeita: Recent findings shed new light on this once well-understood condition. *Genetics IN Medicine*. v. 11, n 6, p. 375-385. 2009.
- BECKER J. et al. Exome sequencing identifies truncating mutations in human SERPINF1 in autosomal-recessive Osteogênese Imperfeita. *The American Journal of Human Genetics*. v. 88, 362–371, March 11. 2011.
- BEN AMOR I. M., et al. Severe Osteogênese Imperfeita Caused by a Small In-Frame Deletion in CRTAP. *American Journal of Medical Genetics part A*. n.155. p.2865–2870. 2011.
- BODIAN D. L., et al. Mutation and polymorphism spectrum in Osteogênese Imperfeita type II: implications for genotype–phenotype relationships. *Human Molecular Genetics*. v. 18, nº 3, p. 463–471. 2009.
- BYERS P. H., et al. Genetic evaluation of suspected Osteogênese Imperfeita (OI). *Genetics IN Medicine*. v. 8, n. 6, p. 383-388. 2006.

CABRAL W.A., et al. Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe Osteogênese Imperfeita. *Nature Genetics* . v.39, n.3, p.359-365.2007.

CAPARRO´ S-MARTIN J.A., et al. Clinical and Molecular Analysis in Families With Autosomal Recessive Osteogênese Imperfeita Identifies Mutations in Five Genes and Suggests Genotype–Phenotype Correlations. *AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS Part A*. 161A, p.1354–1369. 2013.

CHANG W., et al. Prolyl 3-hydroxylase 1 and CRTAP are mutually stabilizing in the endoplasmic reticulum collagen prolyl 3-hydroxylation complex. *Human Molecular Genetics*. v. 19. n. 2. p. 223 – 234. 2009.

CHOI J. W., et al. Severe Osteogênese Imperfeita in Cyclophilin B–Deficient Mice. *PLoS Genetics*. v. 5, p. 1-2. 2009.

CHO S.Y., et al. Osteogênese Imperfeita Type VI with Severe Bony Deformities Caused by Novel Compound Heterozygous Mutations in SERPINF1. *J Korean Med Sci*. v. 28, p.1107-1110. 2013.

CHRISTIANSEN H. E., et al. Homozygosity for a Missense Mutation in SERPINH1, which Encodes the Collagen Chaperone Protein HSP47, Results in Severe Recessive Osteogênese Imperfeita. *The American Journal of Human Genetics*. v. 86. p. 389–398. 2010.

DALGLEISH, R. (1997) The human type I collagen mutation database. *Nucleic Acids Research* 25: 181-187.

DALGLEISH, R. (1998) The human collagen mutation database 1998. *Nucleic Acids Research* 26: 253-255.

FAHIMINIYA S., et al. Mutations in WNT1 are a cause of osteogenesis imperfect. *J Med Genet*. v. 50. p. 345–348. 2013.

FAHIMINIYA, S., et al. Osteoporosis Caused by Mutations in PLS3: Clinical and Bone Tissue Characteristics. *Journal of Bone and Mineral Research*. v. 29, n. 8, p. 1805–1814. 2014.

FAQEIH E., et al. WNT1 mutation with recessive Osteogênese Imperfeita and profound neurological phenotype. *J Med Genet*. v. 50, p.491-492. 2013.

FARBER, C.R., et al. A Novel IFITM5 Mutation in Severe Atypical Osteogênese Imperfeita Type VI Impairs Osteoblast Production of Pigment Epithelium-Derived Factor. *J Bone Miner Res*. v. 29(6), p. 1402–1411. 2014.

FORLINO, A. et al. New perspectives on osteogenesis imperfect. *Nat. Rev. Endocrinol*. v. 7, p.540–557. 2011.

FRATZL-ZELMAN N., et al. CRTAP deficiency leads to abnormally high bone matrix mineralization in a murine model and in children with Osteogênese Imperfeita type VII. *Bone*. n.46. p. 820–826. 2010.

FRATZL-ZELMAN, N., et al. Classification of Osteogênese Imperfeita. *Wien Med Wochenschr*. v. 165, p. 264–270. 2015.

GARSTANG, J. *Burial Customs of Ancient Egypt*. Constable, London. 1907.

GLORIEUX, F.H. et al. Osteogênese Imperfeita type VI: a form of brittle bone disease with a mineralization defect. *J. Bone Miner*. n. 17, p. 30–38. 2002.

- GRAY P.H.K. A case of Osteogênese Imperfeita, associated with dentinogenesis imperfecta, dating from antiquity. *Clin. RadioL.* v. 20, p. 106-108. 1969.
- GUILLE'N-NAVARRO, E. Two Mutations in IFITM5 Causing Distinct Forms of Osteogênese Imperfeita. *Am J Med Genet Part A.* v. 164A, p. 1136–1142. 2014.
- HA-VINH R., et al. Phenotypic and Molecular Characterization of Bruck Syndrome (Osteogênese Imperfeita With Contractures of the Large Joints) Caused by a Recessive Mutation in PLOD2. *American Journal of Medical Genetics.* v.131A, p.115–120. 2004.
- HOYER-KUHN, H. A Nonclassical IFITM5 Mutation Located in the Coding Region Causes Severe Osteogênese Imperfeita With Prenatal Onset. *Journal of Bone and Mineral Research.* v. 29, No. 6, p. 1387–1391. 2014.
- HOMAN E.P., et al. Mutations in SERPINF1 Cause Osteogênese Imperfeita Type VI. *Journal of Bone and Mineral Research.* v. 26, No. 12, pp 2798–2803, December. 2011.
- KELLEY B.P., et al., Mutations in FKBP10 Cause Recessive Osteogênese Imperfeita and Bruck Syndrome. *Journal of Bone and Mineral Research.* v. 26. n. 3, p. 666–672. March, 2011.
- KEUPP K., et al. Mutations in WNT1 Cause Different Forms of Bone Fragility. *The American Journal of Human Genetics.* v. 92, p. 565–574, April 4. 2013.
- LAINE C. M., et al. WNT1 Mutations in Early-Onset Osteoporosis and Osteogênese Imperfeita. *The new england journal of medicine.* v.19. n.368. p. 1809-1816. 2013.
- LAPUNZINA P., et al. Identification of a Frameshift Mutation in Osterix in a Patient with Recessive Osteogênese Imperfeita. *The American Journal of Human Genetics.* v. 87, p.110–114. 2010.
- LOWENSTEIN E.J. Osteogênese Imperfeita in a 3,000-year-old mummy. *Childs Nerv Syst.* v. 25, p. 515–516. 2009.
- MAASALU, K., et al. Whole-exome sequencing identifies de novo mutation in the COL1A1 gene to underlie the severe Osteogênese Imperfeita. *Human Genomics.* p. 9:6. 2015.
- MARINI J.C., et al. Components of the Collagen Prolyl 3-Hydroxylation Complex are Crucial for Normal Bone Development. *Lands Bioscience,* v.6, p.1675-1681.2007.
- MARINI J.C., et al. Null mutations in LEPRE1 and CRTAP cause severe recessive Osteogênese Imperfeita. *Cell Tissue Res.* v.339, p.59-70. 2010.
- MARTINEZ-GLEZ V., et al. Identification of a mutation causing deficient BMP1/mTLD proteolytic activity in autosomal recessive osteogenesis imperfect. *HUMAN MUTATION.* v. 33, n. 2, p.343–350. 2012.
- MORELLO R., et al. CRTAP is required for prolyl 3- hydroxylation and mutations cause recessive Osteogênese Imperfeita. *Cell.* v. 127, p.291-304. 2006.
- OOSTRA RJ, Baljet B, Dijkstra PF, Hennekam RCM. Congenital anomalies in the teratological collection of Museum Vrolik in Amsterdam, The Netherlands. II: Skeletal dysplasias. *Am J Med Genet.* v. 77, p.116-134. 1998.

PYOTT S.M., et al. Mutations in PPIB (cyclophilin B) delay type I procollagen chain association and result in perinatal lethal to moderate Osteogênese Imperfeita phenotypes. *Human Molecular Genetics*. v. 20, p. 1595–1609, n. 8. 2011.

PYOTT S. M., et al. WNT1 Mutations in Families Affected by Moderately Severe and Progressive Recessive Osteogênese Imperfeita. *The American Journal of Human Genetics*. v. 92, p. 590–597, April 4, 2013.

PUIG-HERVÁS M. T., et al. Mutations in PLOD2 Cause Autosomal Recessive Connective Tissue Disorders Within the Bruck Syndrome—Osteogênese Imperfeita Phenotypic Spectrum. *HUMAN MUTATION*, v.33, n.10, p.1444–1449. 2012;

RAUCH F., et al. Lack of circulating pigment epithelium-derived factor is a marker of Osteogênese Imperfeita type VI. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. August 1, v. 97 n. 8 p.E1550-E1556. 2012.

SCHWARZE U., et al. Mutations in FKBP10, which result in Bruck syndrome and recessive forms of Osteogênese Imperfeita, inhibit the hydroxylation of telopeptide lysines in bone collagen. *Human Molecular Genetics*. v. 22, n. 1, p. 1–17 . 2013.

SEMLER, O. A Mutation in the 50-UTR of IFITM5 Creates an In-Frame Start Codon and Causes Autosomal-Dominant Osteogênese Imperfeita Type V with Hyperplastic Callus. *The American Journal of Human Genetics*. v. 91, p. 349–357. 2012.

SETIJOWATI E.D., et al. A novel homozygous 5 bp deletion in FKBP10 causes clinically Bruck syndrome in an Indonesian patient. *European Journal of Medical Genetics*. v. 55. p.17-21. 2012.

SHAHEEN R., et al. FKBP10 and Bruck Syndrome: Phenotypic Heterogeneity or Call for Reclassification? *The American Journal of Human Genetics*. v.87. p.306–308. August 13, 2010.

SHAHEEN R., et al. Mutations in FKBP10 Cause Both Bruck Syndrome and Isolated Osteogênese Imperfeita in Humans. *AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS PART A*. v.155. p.1448–1452. 2011.

SHAHEEN R., et al. Study of autosomal recessive Osteogênese Imperfeita in Arabia reveals a novel locus defined by TMEM38B mutation. *J Med Genet*. v.49, p.630–635. 2012.

SILLENCE D. O., et al., Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfect. *Journal of Medical Genetics*. v. 16, p. 101-116. 1979.

STEINLEIN O. K., et al., Mutations in FKBP10 can cause a severe form of isolated Osteogenesis imperfect. *BMC Medical Genetics*. v. 12:152. p. 1-4.2011.

SYMOENS S., et al. Deficiency for the ER-stress transducer OASIS causes severe recessive osteogenesis imperfect in humans. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. v.8, p.1-6. 2013.

TUCKER T., et al. A Co-Occurrence of Osteogênese Imperfeita Type VI and Cystinosis. *AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS PART A*. 158A, p.1422–1426. 2012.

VALLI M., et al. Deficiency of CRTAP in non-lethal recessive Osteogênese Imperfeita reduces collagen deposition into matrix. *Clin Genet*. n. 82, p. 453–459. 2012.

VAN DER SLOT A.J., et al. Identification of PLOD2 as Telopeptide Lysyl Hydroxylase, an Important Enzyme in Fibrosis. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. v. 278, n. 42, p. 40967–40972. 2003.

VAN DIJK F.S., et al. CRTAP mutations in lethal and severe Osteogênese Imperfeita: the importance of combining biochemical and molecular genetic analysis. European Journal of Human Genetics. v.17, p. 1560 – 1569. 2009.

VAN DIJK F.S., et al. Classification of Osteogênese Imperfeita revisited. European Journal of Medical Genetics. v. 53, p. 1-5. 2010.

VAN DIJK, F S., et al. PLS3 Mutations in X-Linked Osteoporosis with Fractures. Med. v. 369, p. 1529-36. 2013.

VAN DIJK F.S. and D.O. Sillence. Osteogenesis Imperfecta: Clinical Diagnosis, Nomenclature and Severity Assessment. Am J Med Genet Part A n. 164 A, p.1470–1481. 2014.

VENTURI G., et al. A novel splicing mutation in FKBP10 causing Osteogênese Imperfeita with a possible mineralization defect. Bone. n. 50. p. 343–349. 2012.

VENTURI G., et al. Lack of Expression of SERPINF1, the Gene Coding for Pigment Epithelium-Derived Factor, Causes Progressively Deforming Osteogênese Imperfeita With Normal Type I Collagen. Journal of Bone and Mineral Research. v. 27, n. 3, p. 723–728. 2012.

VOLODARSKY M., et al. A Deletion Mutation in TMEM38B Associated with Autosomal Recessive Osteogênese Imperfeita. HUMAN MUTATION. v. 34. n. 4. p. 582–586. 2013.

WEIZHONG C., et al. Prolyl 3-hydroxylase 1 and CRTAP are mutually stabilizing in the endoplasmic reticulum collagen prolyl 3-hydroxylation complex. Human Molecular Genetics. v.19, n.2, p.223-234. 2010.

WILLAERT A., et al. Recessive Osteogênese Imperfeita caused by LEPRE1 mutations: clinical documentation and identification of the splice form responsible for prolyl 3-hydroxylation. J Med Genet. V.46, p. 233-241. 2009.